

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: neurovědy



MUDr. Karolína Turnovcová

Využití kmenových buněk v experimentálním modelu iktu

The use of stem cells in the experimental model of stroke

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph. D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 10. 3. 2015

MUDr. Karolína Turnovcová

Podpis

Identifikační záznam:

TURNOVCOVÁ, Karolína. *Využití kmenových buněk v experimentálním modelu iktu [The use of stem cells in the experimental model of stroke]*. Praha, 2015. s., příl. Disertační práce (Ph. D.) Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav neurověd. Akademie věd České republiky v. v. i., Ústav experimentální medicíny, 2015. Vedoucí práce Jendelová, Pavla.

Klíčová slova:

mozek, kmenová buňka, neurální prekursor, nanočástice, průtoková cytometrie, magnetická rezonance, iktus, uzávěr střední mozkové arterie

brain, stem cell, neural precursor, nanoparticle, flow cytometry, magnetic resonance imaging, stroke, middle cerebral artery occlusion

Poděkování

všem, kteří se se podíleli na publikacích, na kterých je založena tato práce

všem, kteří četli rukopis a věnovali mu svůj čas a cenné připomínky

1. Obsah

1. Obsah.....	8
2. Seznam zkratk	10
3. Úvod do problematiky	13
3.1. Iktus.....	13
3.1.1. Civilizační onemocnění, cévní onemocnění, morbidita a mortalita u nás a ve světě	13
3.1.2. Cévní zásobení mozku	16
3.1.3. Patofyziologie ischemického iktu	18
3.1.4. Typologie mozkové ischemie a příčiny	19
3.1.5. Dělení cévních mozkových příhod dle trvání	20
3.1.6. Rizikové faktory.....	21
3.1.7. Terapie iktu	21
3.2. Modely ischemického iktu u zvířat.....	22
3.3. Buněčná terapie.....	24
3.3.1. Kmenové buňky	24
3.3.2. Buněčná terapie, mechanismus účinku	31
3.3.3. Zdroje buněk pro buněčnou terapii	32
3.4. Klinické studie	34
3.5. Značení buněk a sledování <i>in vivo</i>	35
4. Hypotézy a cíle práce	38
4.1. Hypotézy.....	38
4.2. Dílčí cíle práce	38
5. Výsledky	39
5.1. Použití <i>in vitro</i> derivovaných lidských neurálních prekursorů v modelu iktu	39

5.1.1. Úvod.....	39
5.1.2. Metodika	41
5.1.3. Výsledky	47
5.1.4. Závěr	56
5.2. Pěstování mesenchymálních kmenových buněk v různých médiích	57
5.2.1. Úvod.....	57
5.2.2. Metodika	59
5.2.3. Výsledky	61
5.2.4. Závěr	65
5.3. Magnetické částice v biomedicínských aplikacích	66
5.3.1. Úvod.....	66
5.3.2. Metodika	68
5.3.3. Výsledky	72
5.3.4. Závěr	79
6. Obecná diskuse	80
7. Zhodnocení cílů a hypotéz	96
8. Souhrn	97
9. Summary	98
10. Publikace autorky	99
11. Seznam literatury	101
12. Publikace, které jsou podkladem práce	127

2. Seznam zkratek

15-F_{2t}-IsoP – 15-F_{2t}-isoprostan

AA – kyselina askorbová (ascorbic acid)

alpha-MEM – alpha-Minimum Essential Medium

APTES – (3-aminopropyl)triethoxysilan

ASCs – tukové stromální buňky (adipose-derived stem cells)

BDNF – neurotrofický faktor derivovaný z mozku (brain-derived neurotrophic factor)

bFGF – bázičský fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)

BM – kostní dřev (bone marrow)

BMP – kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)

BMSCs – stromální buňky z kostní dřevě (bone marrow stromal cells)

CADASIL – autozomálně dominantní cerebrální arteriopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy)

CBF – mozkový průtok (cerebral blood flow)

CFU – jednotky tvořící kolonie (colony forming units)

CCL a CXCL – chemokinové (C-C motif) a (C-X-C motif) ligandy

CMCS – karboxymetylchitosan (carboxymethyl chitosan)

CMP – cévní mozková příhoda

CSCs – kmenové nádorové buňky (cancer stem cells)

CXCR4 – C-X-C chemokinový receptor typu 4 (C-X-C chemokine receptor type 4)

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DARPP-32 – dopaminem a cAMP řízený neuronální fosfoprotein (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein)

DC – dendritická buňka (dendritic cell)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EpSC a EPCs – endoteliální kmenové buňky a progenitory (endothelial stem cells, endothelial progenitor cells)

FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBS – fetální hovězí sérum (foetal bovine serum)

FITC – fluorescein isothiokyanát (fluorescein isothiocyanate)

FPG – fluorescence plus Giemsa technique

GABA – kyselina gama-aminomáselná (γ-aminobutyric acid)

G-CSF – faktor stimulující granulocytové kolonie (granulocyte-colony stimulating factor)

GDNF – neurotrofický faktor derivovaný z gliových buněčných linií (glial cell line-derived neurotrophic factor)

GFAP – gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillar acidic protein)

GM-CSF – faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie (granulocyte-monocyte-colony stimulating factor)

GMO – geneticky modifikovaný organismus

hABS – lidské sérum od donorů AB krevní skupiny (human AB serum)

hCBS – lidské pupečnickové sérum (human cord blood serum)

HDP – hrubý domácí produkt

hESC – lidské embryonální kmenové buňky (human embryonic stem cells)

hESC-NPs – neurální prekursori derivované z lidských embryonálních buněk (human embryonic stem cell-derived neural precursors)

HGF – hepatální růstový faktor (hepatocyte growth factor)

hiPS-ENPs – neurální progenitory derivované z lidských indukovaných pluripotentních buněk (human induced pluripotent cell-derived early neural precursors)

hiPS-NPCs – neurální progenitory derivované z lidských indukovaných pluripotentních buněk (human induced pluripotent cell-derived early neural progenitors)

hMSC – lidské mesenchymální stromální buňky (human mesenchymal stromal cells)

hrEGF – lidský rekombinantní epidermální růstový faktor (human recombinant epidermal growth factor)

hrFGF – lidský rekombinantní fibroblastový růstový faktor (human recombinant fibroblast growth factor)

HSCs – hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells)

hTERT – lidská reverzní transkriptáza telomerázy (human telomerase reverse transcriptase)

hTGF-beta1 – lidský transformující růstový faktor beta 1 (transforming growth factor β)

HuNu – lidská jádra (human nuclei)

IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor-1 (insulin-like growth factor 1)

iNOS – inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)

IL – interleukin

iPS – indukované pluripotentní buňky (induced pluripotent stem cells)

ISCT – Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (International Society for Cellular Therapy)

LIF – leukemický inhibiční faktor (leukemia inhibitory factor)

LP – léčivý přípravek

LSCs – epiteliální limbální kmenové buňky (limbal epithelial stem cells)

MAP2 – protein 2 asociovaný s mikrotubuly (microtubule-associated protein 2)

MCA – a. cerebri media

MCAo – uzávěr arteriae cerebri mediae (middle cerebral artery occlusion)

M-CSF – faktor stimulující makrofágové kolonie (macrophage colony-stimulating factor)

MEF – myší embryonální fibroblasty (mouse embryonic fibroblasts)

MELAS – mitochondriální encefalomyopatie s laktátovou acidózou a stroke-like epizodami (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes)

MSCGM – růstové médium pro mesenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium)

MTCO2 – mitochondriální podjednotka cytochromu c II (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II)

NCAM – neurální adhezí molekula (neural cell adhesion molecule)

NF70, NF160 – neurofilamenta o 70 nebo 160 kD

NGF – nervový růstový faktor (nerve growth factor)

NGFR – receptor pro nervový růstový faktor (nerve growth factor receptor)

NPs – neurální prekursori (neural precursors)

NSCs – neurální kmenové buňky (neural stem cells)

NSE – neuron-specifická enoláza (neuron-specific enolase)

NT-3 – neurotrofin 3

PBS – sodnofosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)

PD – zdvojení populace (population doublings)

PDGF – destičkový růstový faktor (platelet derived growth factor)

PDMAAm – poly-(N,N'-dimethylakrylamid)

PF – paraformaldehyd (paraformaldehyde)

PGE-2 – prostaglandin E2

PLL – poly-L-lysin

PSA-NCAM – neurální adhezni molekula modifikovaná polysialovou kyselinou (polysialylated neuronal cell adhesion molecule)

RIND – reverzibilní ischemický neurologický deficit (reversible ischemic neurologic deficit)

rMSC – potkaní mesenchymální stromální buňky (rat mesenchymal stromal cells)

ROS – kyslíkové radikály (reactive oxygen species)

rt-PA – rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu (recombinant tissue plasminogen activator)

SDF-1 – faktor derivovaný ze stromálních buněk (stromal cell-derived factor 1)

Shh – Sonic hedgehog

SN – substantia nigra

SPION – superparamagnetické nanočástice založené na oxidech železa (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)

SSEA – vývojově specifický embryonální antigen (stage-specific embryonic antigen)

SVZ – subventrikulární zóna

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

TEOS – tetraetoxysilan

TH – tyrosinhydroxyláza

TIA – tranzitorní ischemická ataka

TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

USPION – velmi malé superparamagnetické nanočástice založené na oxidech železa (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles)

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

vSELs – velmi malé buňky podobné embryonálním (very small embryonic-like stem cells)

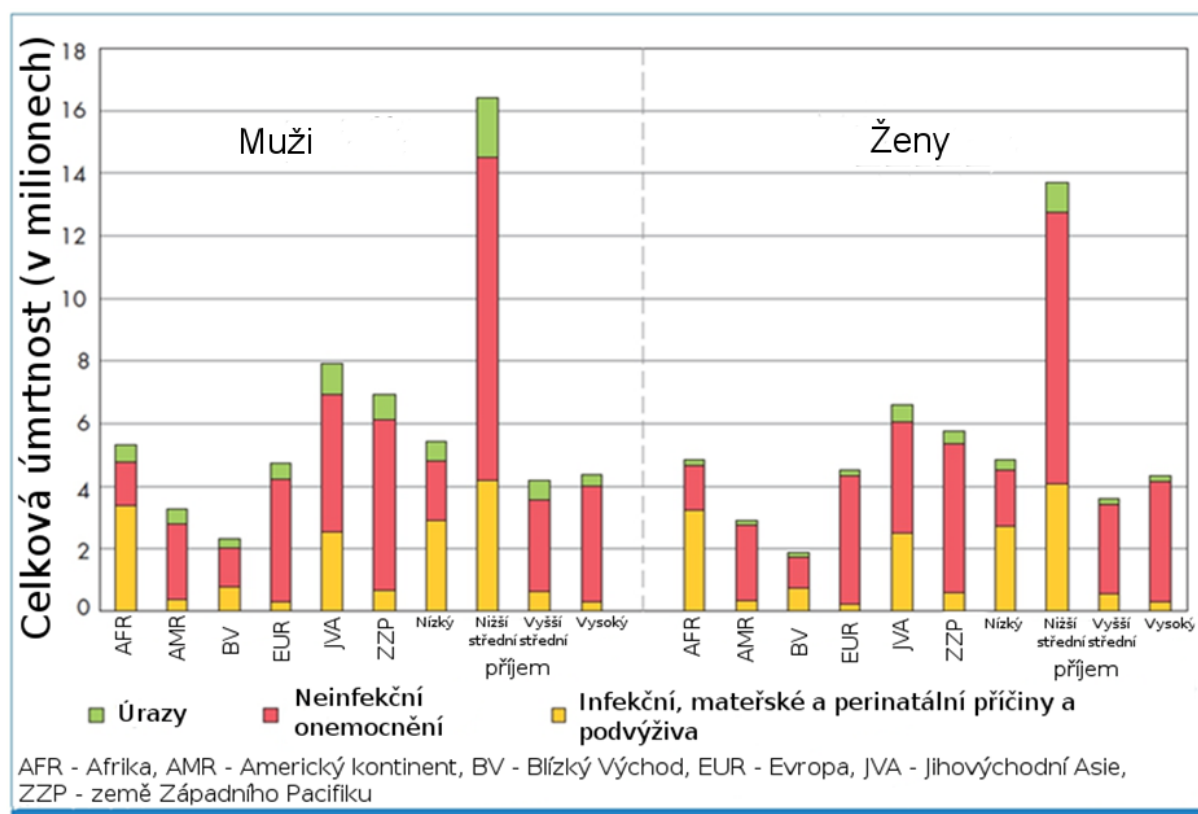
WST-1 – test rozkladu tetrazoliových solí (Water Soluble Tetrazolium salt Test 1)

3. Úvod do problematiky

3.1. Iktus

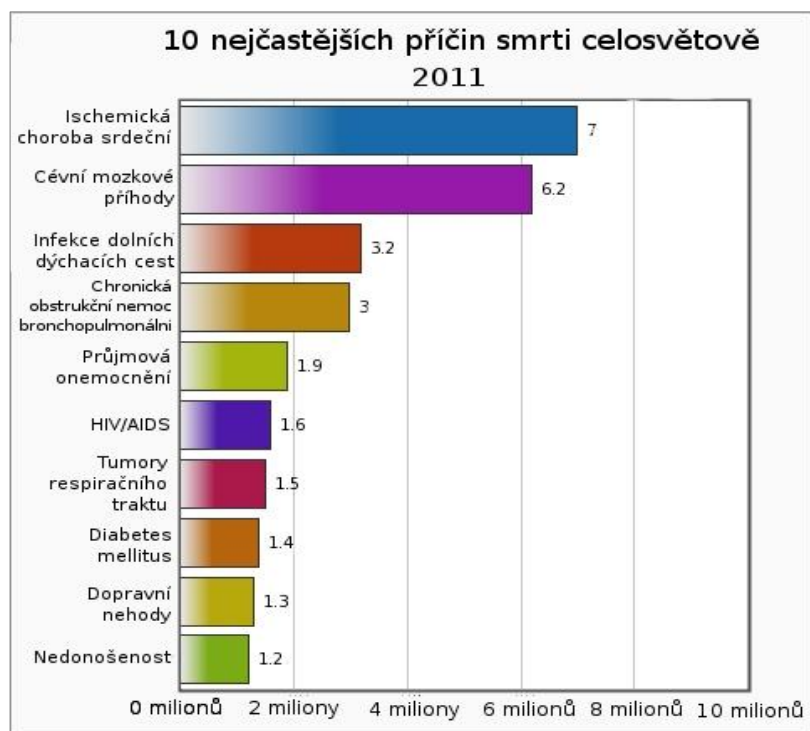
3.1.1. Civilizační onemocnění, cévní onemocnění, morbidita a mortalita u nás a ve světě

Cévní mozkové příhody patří mezi tzv. civilizační nemoci, kam vedle cerebrovaskulárních onemocnění patří diabetes, onkologická onemocnění, chronická respirační onemocnění, obezita, hypertenze a další. V rozvinutých zemích patří ke špičce v mortalitě a morbiditě. S výjimkou afrického kontinentu, kde ke hlavním příčinám smrti patří infekční choroby, malnutrice, porodnické komplikace a perinatální komplikace, jsou civilizační onemocnění hlavní příčinou smrti (vztaženo na celou populaci včetně nezletilých osob) (obr.1).



Obr. 1: Úmrtnost celosvětově. Upraveno podle Global Burden of Disease (WHO 2012)

V roce 2008 u evropských mužů se úmrtnost na civilizační nemoci odhaduje až třináctkrát vyšší než úmrtnost z ostatních příčin, v zemích západního Pacifiku osmkrát. Odhaduje se, že neinfekční příčiny zatlačí jiné příčiny úmrtí do roku 2030 včetně afrického kontinentu. V zemích s nízkým HDP výskyt neinfekčních nemocí stoupá, v roce 2011 je celosvětově vedoucí příčinou smrti ischemická choroba srdeční, na druhém místě následuje iktus (obr. 2) (WHO 2014).



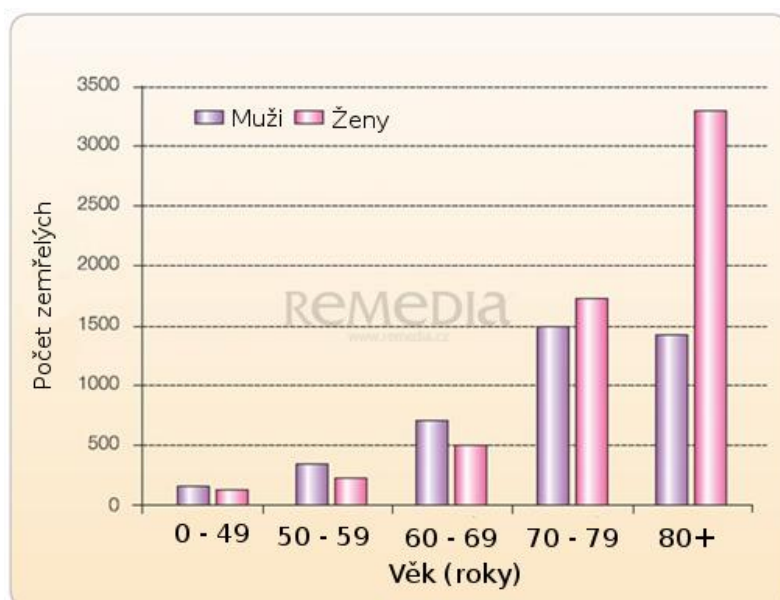
Obr. 2: Deset nejčastějších příčin smrti celosvětově. Upraveno dle The top 10 causes of death (WHO 2014).

V České republice dosahuje morbidita a mortalita na cerebrovaskulární onemocnění dvou- až třinásobných hodnot ve srovnání s vyspělými zeměmi EU a USA. Incidence cévních mozkových příhod (CMP) se pohybuje v různých zemích Evropské unie mezi 185-300/100 000 a v České republice mezi 250-300/100 000 obyvatel. Ve vyšších věkových kategoriích incidence stoupá a čítá téměř 600/100 000 ve věkové skupině 65 – 70 let. U pacientů v prvních pěti letech po prvním mozkovém infarktu se recidiva vyskytuje ve 20 %. Úmrtnost činí v průběhu tří měsíců po cévní mozkové příhodě 15 – 20 % (17 – 34 % v prvním měsíci v USA, dvojnásobek u nás) (Jedlička a Keller 2005). Incidence CMP u obou pohlaví exponenciálně roste s věkem, po 55. roce se s každým desetiletím zdvojnásobuje. Tři čtvrtiny nemocných je starších 65. let. Jeden ze čtyř mužů a jedna z pěti žen do 85 let prodělá CMP. Čtvrtinu CMP tvoří příhody opakované, riziko rekurence je nejvyšší v prvních týdnech po prodělané příhodě, rekurence dosahuje 10–15 % v prvním roce a až 4 % ročně v letech následujících. Je vyšší u starších pacientů a po těžších příhodách. S věkem počet zemřelých na cévní onemocnění mozku exponenciálně stoupá, 90 % zemřelých na CMP bylo ve věku 65 a více let (Bruthans 2009). Počet zemřelých na CMP je vyšší u žen, a to především proto, že se dožívají vyššího věku než muži a mají nižší incidenci ischemické choroby srdeční (obr. 3). I přes zlepšení v možnostech akutní léčby se počet invalidních lidí po cévní mozkové příhodě pohybuje v rozmezí mezi 20 – 30 %. Náklady na léčbu a sociální zajištění pacientů po CMP přesahují ve Spojených státech 43 miliard dolarů ročně. V České republice nejsou tato data známa (Bar a Chmelová 2011), jsou pouze vypočtena extrapolací dat ze zemí, kde známa jsou (tab. 1) (Ehler et al. 2013).

Nemoc	Přímé medicínské náklady (€)	Přímé nemedicínské náklady (€)	Nepřímé náklady (€)	Náklady celkem (€)
poruchy příjmu potravy	0.74	0.11	0.16	1.01
mozkové nádory	3.99	n.a.	1.89	5.88
neuromuskulární poruchy	2.19	2.26	4.16	8.6
epilepsie	7.4	1.94	4.42	13.77
roztroušená skleróza	5.85	5.08	3.9	14.83
Parkinsonova nemoc	9.65	9.94	3.26	22.85
somatoformní poruchy	12.1	n.a.	11.36	23.45
nemoci u dětí a mladistvých	2.75	26.64	n.a.	29.39
osobnostní poruchy	4.24	4.47	20.81	29.52
poranění mozku	12.02	5.22	17.95	35.19
spánkové poruchy	24.02	n.a.	15.27	39.29
bolesti hlavy	10.72	n.a.	30.51	41.23
mentální retardace	37.01	23.34	n.a.	60.35
závislost	28.8	23.57	24.37	76.74
úzkostné poruchy	57.71	0.18	27.33	85.22
demence	12.67	73.34	n.a.	86.01
psychózy	35.61	n.a.	65.67	101.28
afektivní poruchy	31.89	24.58	68.47	124.94
cévní mozkové příhody	95.73	45.12	9.08	149.92
celkem	395.08	245.8	308.61	949.48

Tab. 1: Struktura nákladů na léčbu nemocí mozku vztažená na obyvatele a rok v ČR (2010). Z tabulky vyplývá, že cévní nemoci mozku jsou finančně nejnáročnější skupinou onemocnění ze všech poruch mozku. Náklady byly v zpracovány v hodnotách euro korigovaných na paritu kupní síly (€PPP) (Ehler et al. 2013)

V ČR je nejčastější příčinou nemocniční péče ischemická choroba srdeční, cerebrovaskulární onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou hospitalizace. Na cévní onemocnění mozku připadá v ČR každoročně přibližně jedna desetina zemřelých. V roce 2010 proběhlo v nemocnicích v ČR 57 484 hospitalizací pro cévní nemoci mozku (dg. I60–I69) u 41 690 osob, s průměrnou délkou hospitalizace 14,8 dne. Z tohoto počtu hospitalizovaných 5 826 osob v nemocnici zemřelo. Celkem na tato onemocnění v daném roce zemřelo v ČR 11 567 osob (ÚZIS ČR 2012).



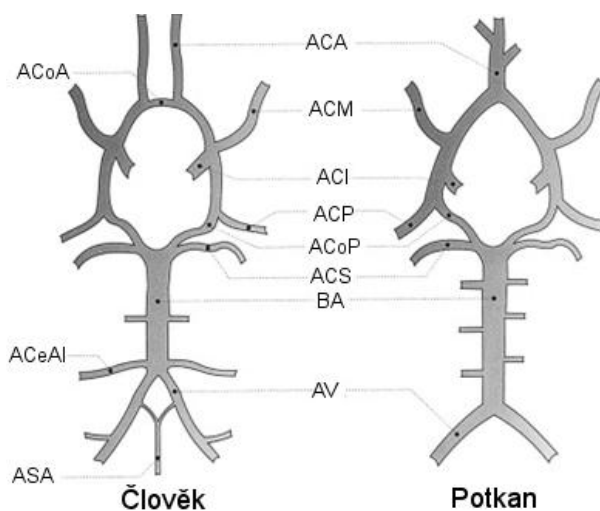
Obr. 3: Mortalita v důsledku cévní mozkové příhody podle věku a pohlaví v ČR (2005) (Bruthans 2009)

Nejvyšší počet případů zaujímají cévní nemoci mozku diagnostikované jako mozkový infarkt a cévní příhoda mozková neurčená jako krvácení nebo infarkt, kde se vlivem lepší diagnostiky od roku 2003

do roku 2010 postupně přesouvá polovina případů do kategorie mozkový infarkt. Ischemické cévní příhody zaujímají mezi cévními příhodami cca 80 %, na krvácivé připadá zbývajících 20 % (Mummenthaler a Mattle 2001).

3.1.2. Cévní zásobení mozku

Cévní zásobení mozku je zprostředkováno dvěma a. car. internae odstupujícími z bifurkace s a. car. communis a dvěma a. vertebrales, které se po prostupu skrz foramen magnum spojují do jedné a. basilaris na vetrální ploše mozkového kmene. Podíl karotického řečiště činí 85 % na celkovém přívodu krve, basilární řečiště se podílí pouze 15 % (míněno u člověka, u potkana, jako předmětu výzkumné práce, se vzájemné poměry a podíl krve přiváděný jednotlivými tepnami může lišit, a to i mezi jednotlivými kmeny r. norvegicus). Tyto tepny se na bazi mozku spojují do tzv. Willisova okruhu obepínajícího chiasma opticum, hypofýzu a corpora mammillaria a vydávají šest hlavních (magistrálních) mozkových arterií, a. cerebri anteriores, mediae a posteriores. Tyto větve se ihned po odstupu větví a vydávají jak větve, co obkružují hemisféry po jejich povrchu, tak větve, co přímo pronikají do hloubi bílé hmoty hemisfér, thalamu a bazálních ganglií. Jednotlivé tepny a spojky Willisova okruhu nejsou stejnocenné, největší průměr, průtok a zásobovací oblast má a. cerebri media jako pokračování a. carotis internae.

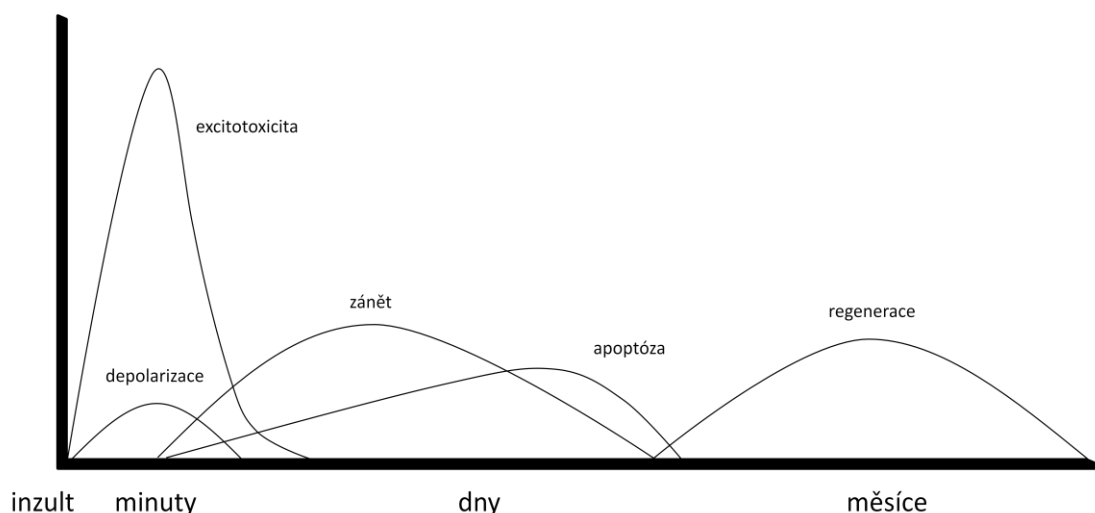


Obr. 4: Willisův okruh u člověka a potkana. ACA – a. cerebri anterior, ACoA – a. communicans anterior, ACM – a. cerebri media, ACI – a. carotis interna, ACP – a. cerebri posterior, ACoP – a. communicans posterior, ACS – a. cerebelli superior, AB – a. basilaris, ACeAI – a. cerebelli anterior inferior, AV – a. vertebralis, ASA – a. spinalis anterior (Farkas a Luiten 2001)

U člověka a potkana dále nacházíme další rozdíly, mezi nejvýznamnější patří nepřítomnost a. communicans anterior u potkana a významná olfaktorická arterie, která odstupuje z a. cerebri anterior a která u člověka chybí (obr. 4). U člověka i u potkana se v utváření Willisova okruhu a jeho větví vyskytují variability, které mohou významným způsobem zasáhnout do tíže a průběhu mozkové

ischemie. U potkana byly nalezeny variability v odstupu a dalším větvení a. cerebri media nebo jednostranná či oboustranná nepřítomnost a. communicans posterior, což může vést k úplnému oddělení intrakraniálního basilárního a karotického řečiště (Fox et al. 1993; Wang-Fischer 2009). U člověka jsou varianty v utváření Willisova okruhu nalézány ve více jak polovině vyšetřených případů, nejčastěji je postižováno řečiště basilární ve smyslu hypoplazie jednostranné a. cerebri posterior (10 % sekčních nálezů) nebo a. communicans posterior (13 % sekčních nálezů) (Kapoor et al. 2008). Jednotlivé větve magistralních tepen, magistralní tepny mezi sebou a s extrakraniálními tepnami mohou vytvářet variabilní počet anastomóz o různé kapacitě průtoku. Na takto vytvořených či naopak chybějících kolaterálách může záviset dopad a tíže lokální mozkové ischemie, kdy uzávěr jedné přírodní tepny může u jednoho pacienta vést k přechodné mírné ischemii, zatímco u jiného bez kolaterál bude rozsah iktu veliký a prognóza infaustní (Mummenthaler a Mattle 2001).

Mozek, ačkoliv zahrnuje pouze 2 % hmotnosti těla, odebírá cca 25 % minutového srdečního výdeje. Nároky mozku na kyslík a glukózu jsou 110 $\mu\text{mol O}_2/100 \text{ g tkáň/min}$ a 25 $\mu\text{mol glukózy}/100 \text{ g tkáň/min}$. Fyziologický klidový mozkový průtok (cerebral blood flow – CBF) má v dospělosti střední hodnotu cca 50 – 60 ml/100 g tkáň/min (v dětství dvojnásobek). Tento průtok má značné rezervy. Při těchto hodnotách stačí tkáni odebírat cca polovinu přinášeného kyslíku a glukózy, takže venózní krev je na konci kapilárního řečiště ještě z poloviny satureovaná kyslíkem. Při intenzivní buněčné práci dochází k prudce zvýšené extrakci O_2 (kyslíková extrakční rezerva). K projevům mozkové ischemie začíná docházet, až když CBF poklesne k hodnotám 22 – 18 ml/100 g/min a níž (při normoxémii, záleží také na teplotě organismu). Hodnoty v oblasti penumbry dosahují mezi 18 – 12 ml/100 g tkáň/min a v oblastech těžké ischemie se pohybují pod 12 ml/100g/min. Při absolutním výpadku krevního zásobení či anoxii dochází ke stavu funkčního „ticha“ do 10 sekund a vitalita neuronů přetrvává pouhých 8 minut, než dojde k nezvratné buněčné smrti. Po této době začnou postupně zanikat i buňky glie a jako poslední podléhá buněčné smrti cévní endotel.



Obr. 5: Časový průběh poškození po ischemické příhodě. Dle Neurogenesis and stem cell transplantation strategies for stroke (Kokaia 2013)

3.1.3. Patofyziologie ischemického iktu

Nervové buňky jsou téměř výhradně závislé na kyslíku a glukóze zpracovávané v procesu oxidativní fosforylace (velmi okrajovým zdrojem zisku ATP je acetát). Při hluboké ischemii a nedostatku ATP selhává Na^+K^+ ATPáza, udržující membránový gradient, do buněk proudí Na^+ a uniká K^+ . V buňkách se zvyšuje koncentrace intracelulárního Ca^{2+} a uvolňují se neurotransmitery včetně excitačního glutamátu (obr. 5). Glutamát uvolněný z porušených neuronů je schopen hyperstimulovat působením v příslušných drahách i struktury vzdálené od místa lokální ischemie. Při trvání ischemie ve vlastním ložisku včetně penumbry dále klesá oxidativní fosforylace, glukóza je metabolizována anaerobně a zvyšuje se tak obsah buněčného laktátu. Další významnou chemickou reakcí je degradace membránových fosfolipidů na volné mastné kyseliny. Zasažené buňky zvětšují osmoticky svůj objem, dochází k intracelulárnímu (cytotoxickému) edému. Při těžké a trvající ischemii změnám podléhají buňky glie, astrocyty uvolňují svůj kontakt se stěnami kapilár a dochází k poruše hematoencefalické bariéry, která je v konečném důsledku narušena i zánikem buněk endotelu a vzniká intercelulární (vazogenní, intersticiální) edém s průnikem vody a plazmatických bílkovin do ložiska. Všechny tyto změny způsobují expanzivní chování ischemického ložiska včetně vzdálených struktur zasažených glutamátovou toxicitou a vazogenním edémem. Vzestup objemu edematózní tkáně v omezeném intrakraniálním prostoru se děje na úkor ostatních kompartmentů a může vést k dalšímu snížení CBF útlakem cév, nebo mozkové herniaci v případě rozsáhlejších ischemických ložisek (Jedlička a Keller 2005).

Po reperfúzi, ať už samovolné nebo medicínské, dochází k rozvoji reperfúzního poškození ischemické tkáně. Dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů, aktivaci komplementu, tvorbě zánětlivých interleukinů a zvýšené kapilární permeabilitě. Vzestup volných kyslíkových radikálů může být příčinou apoptózy buněk, kdy se aktivují kaspázy a apoptózou se tvoří další volné radikály. Volné radikály dále zvyšují hladinu intracelulárního kalcia a tak mohou být příčinou dalšího uvolňování toxického glutamátu a jiných mediátorů. Vzestup reaktivních molekul vede k vyvolání zánětlivé reakce, aktivaci neutrofilů, jejich adhezi na stěny cév, aktivaci fosfolipázy A2, zvýšené permeabilitě cévních stěn a extravazaci tekutiny do ložiska. Volné radikály společně s aktivovanými neutrofily a prozánětlivými interleukiny (IL-6, IL-1, TGF-beta) dále zhoršují situaci v ischemickém ložisku a mohou být příčinou neuspokojivého stavu pacienta i po úspěšné rekanalizaci cévy (Chrissobolis et al. 2011). Riziko významného reperfúzního poškození, které může rozsahem překonat původní škody způsobené hypoxií, stoupá s délkou trvání ischemie a je významnější u úplného přerušení krevního průtoku, než u ischemií s aspoň částečně zachovaným průtokem nebo dostatečně funkčními kolaterálami. Ischemické poškození všech tkání v ložisku včetně buněk endotelu a následný zánět a další zvýšení permeability může vést k rozrušení cévní stěny a ke krvácení do ischemického ložiska – k jeho hemoragické infarzaci.

Jednotlivé oblasti mozku nejsou k hypoxii a ischemii citlivé stejně; k nejcitlivějším patří některé části hippocampu (CA1), bazální ganglia, mozková kůra (zejména vrstvy 3 a 6). Důsledky poškození mohou být poruchy paměti a dalších kognitivních funkcí, fatické poruchy, změny osobnosti, poruchy motorických funkcí apod. (Nečas 2009).

3.1.4. Typologie mozkové ischemie a příčiny

Ischemie může být lokální, nebo globální. Příčiny obou stavů jsou odlišné. U globálních ischemií jde o systémové chorobné stavy, nejčastější příčinou je srdeční zástava se šokovým stavem a oběhovým selháním, další příčinou je respirační selhání. Uplatňují se další příčiny šoku a relativní či absolutní hypovolémie s hypoperfúzí (hypovolemický šok, anafylaktický šok s hypotenzí). Vzácnější příčiny globální ischemie jsou příčiny reologické, např. hyperviskozita krve (polycytémie a další). Nezanedbatelné jsou úrazy a násilné trestné činy (topení, škrcení, otevřená poranění karotid), případně ischemie iatrogenní vznikající během kardiochirurgických operací (Baranowska et al. 2012). Patofyziologií je tedy jak hypoperfúze, tak hypoxémie, oba stavy se mohou kombinovat. V případě globální ischemie nacházíme klinicky nejrozličnější obrazy poruch mozkových funkcí závislých na tíži a délce trvání ischemie. V případě kompletní akutní ischemie jde o poruchy vědomí, u chronických dochází ke kognitivnímu deficitu až demenci, možné jsou pyramidové i extrapyramidové příznaky.

Zobrazovací metody poskytují v případě akutní ischemie až obraz mozkového edému, interteritoriální infarkty (na rozhraní povodí jednotlivých mozkových arterií), u chronických ischemií nalézáme často obraz atrofie mozku s relativním zmnožením mozkomíšního moku a rozšířením komorového systému.

Lokální ischemie (mozkový infarkt v užším slova smyslu) má příčiny makro- a mikroangiopatické. V případě lokálních ischemií jde o jednotlivé uzávěry komponent Willisova okruhu, magistralních arterií a jejich koncových větví, případně o uzávěry mozkových žilních splavů. Na zobrazovacích metodách vidíme klínovitá či globózní ložiska s kolaterálním edémem v povodí odpovídajícím zásobovacím tepnám (teritoriální infarkty, lakunární infarkty). Klinicky se projevují náhlým neurologickým deficitem dle místa zasaženého ischemií, dále bolestmi hlavy, poruchou vědomí, epileptickým záchvatem. Nejčastější makroangiopatickou příčinou je ateroskleróza přívodných tepen a komponent Willisova okruhu.

Mikroangiopatie – týká se cév středního a menšího kalibru, porucha tkví v cévní stěně, např. ložisko hyalinózy, fibrózní dysplazie, amyloidózy, dříve často na podkladě infekce nebo neinfekčního zánětu (vaskulitidy, migréna (Wolf et al. 2011)). Tyto stavy kromě ischemie predisponují i k hemoragickým příhodám. Narůstající význam má diabetes a diabetická mikroangiopatie, která je však spíše než v problematice CMP významným činitelem v rozvoji periferní neuropatie.

Důležitou příčinou je embolizace – nejčastěji ze srdečního ouška levé síně při fibrilaci síní, paradoxní embolizace je možná z končetinových či pánevních žil při otevřeném for. ovale, které zůstává otevřené u 20 – 30 % lidí (Popelová 2003). Tromby mohou vznikat a embolizovat z nestabilních aterosklerotických plátů v aortě, a. car. communis či a. car. interna. K tvorbě trombů a jejich embolizaci do periferie může docházet při získaných i vrozených hyperkoagulačních stavech, u bakteriální endokarditidy apod. Je možná i tuková a vzduchová embolizace, případně embolizace arteficiální (iatrogenní) lékařským materiálem (Mourin et al. 2012; Tekle et al. 2012) při chirurgickém zákroku.

S ikty a stroke-like epizodami se dále setkáváme u vzácnějších stavů, jako jsou střádavé choroby (m. Fabry), moya-moya syndrom, CADASIL, mitochondriální poruchy (MELAS) a mnoho jiných (Mummenthaler a Mattle 2001). Tyto vzácné příčiny se podílejí na celkové etiologii pouhými 4 %, kdežto tromboticko-embolizační a kardiogenně-embolizační (zejména ve věku nad 65 let) příčiny zabírají v součtu téměř 90 %, zbytek připadá na mikroangiopatické případy (Bojar et al. 2002).

3.1.5. Dělení cévních mozkových příhod dle trvání

TIA (transient ischemic attack) – náhlý začátek obtíží, úprava příznaků do 24 hod, typické ataky trvají několik minut. Nejčastěji jde o náhlou poruchu rovnováhy, afázii, hemiparézu či hemianopsii. Mezi podtyp TIA by se dal zařadit amaurosis fugax – rychlá přechodná ztráta zraku způsobená výpadkem zásobení v karotickém povodí nebo povodí a. cerebri media.

RIND (reversible ischemic neurologic deficit) – výpadek trvá déle než 12 hodin, úprava do týdne – považuje se za dokončený stroke s dobrou regenerační schopností pacienta.

Narůstající neurologický deficit (stroke in evolution) – infarkt na základě rostoucího trombu či sukcesivní embolizace, nestabilní symptomatologie.

Trvalý neurologický deficit (completed stroke) – dokončená cévní mozková příhoda s trvalými následky přesahujícími šest měsíců, postižení může být velmi těžké, ale i mírné.

Vaskulární demence a Biswangerova choroba – jde o následky po mnohočetných drobných infarktech, které samy klinicky mohly uniknout pozornosti. Podkladem jsou opakované uzávěry koncových větví mozkových cév, resultující v atrofii zejména podkorové bílé hmoty a okolí komor. Příznaky zahrnují postupné zhoršování intelektových funkcí, poruchy emotivity, z neurologických příznaků často extrapyramidové příznaky, poruchy stoje a chůze a poruchy sfinkterů. Vyskytuje se ve vysokém věku a vzhledem k symptomatologii bývá léčena na psychiatrických a geriatrických odděleních, ne na neurologických pracovištích, byť etiologicky k neurologickým onemocněním patří.

3.1.6. Rizikové faktory

Ateroskleróza je nejvýznamnějším a nejčastějším rizikovým faktorem a příčinou mozkové mrtvice. K rozvoji aterosklerózy disponují hypertenze, dyslipidémie, vyšší věk, hyperhomocysteinémie, kouření, diabetes, který je sám o sobě rizikovým faktorem pro akcelerovaný vývoj aterosklerózy (makroangiopatie) a diabetické mikroangiopatie. U diabetiků 2. typu nacházíme v rámci tzv. metabolického syndromu kromě hyperglykémie vysoký tlak, poruchu krevních tuků a další. Diabetici jsou ve zvýšeném riziku těžších cévních příhod, opakovaných iktů a vyšším riziku smrti na následky CMP.

Ve zvýšeném riziku se ocitají pacienti s hyperkoagulačními stavy, kam patří trombofilní mutace (gen pro faktor V – Leiden, faktor II – protrombin), získané poruchy (autoimunitní onemocnění), stáza krve (znehýbnění po úrazech, dlouhé lety, fibrilace srdečních síní), užívání hormonální antikoncepce nebo substituce (estrogeny), stavy navozující vyšší pohotovost organismu ke srážení krve (traumata, operace, porod, těžká dehydratace, infekce a diseminovaní intravaskulární koagulace).

Mezi neovlivnitelné faktory patří dále věk (nad 60 let), pohlaví (muži), rasa a geografické faktory (Waberžinek a Krajičková 2004)

3.1.7. Terapie iktu

Doporučením je vybudování trojúrovňové sítě pracovišť dle poskytované péče. První úroveň jsou Komplexní cerebrovaskulární centra (KCC) spolupracující s neurologickými pracovišti 2. úrovně – Iktovými centry (IC), která jsou zařazena do sítě nemocnic specializujících se na diagnostiku a léčbu CMP. Třetí úroveň – ostatní cerebrovaskulární péče – představuje subakutní lůžkovou péči v oborech neurologie, vnitřního lékařství a geriatric.

Diagnostický a léčebný postup představuje (ve zjednodušení) zjištění příčiny CMP a stavu mozku pomocí zobrazovacích metod a v případě vyloučení hemoragické cévní příhody zařazení pacienta na IC nebo akutní lůžko neurologického oddělení spádové nemocnice s příslušným vybavením k intravenózní trombolýze. Indikace přijetí pacienta na IC je pouze časová – uvádí se 12 hodin, resp. maximálně 24 hodin od začátku CMP.

Skutečný terapeutický účinek s vymizením příznaků a upravením stavů bez následku má pouze včasné nasazení trombolýzy. Původní časové okno uvádělo 3 h, další studie potvrdily přínos trombolýzy v delším časovém intervalu 4,5 hodiny po začátku příznaků (Ringleb et al. 2008), dokonce 6 hodin, ovšem největší benefit mělo nasazení léčby u pacientů do 3 hodin, poté úspěšnost prudce klesá (Sandercock et al. 2008). Trombolýza je dnes jedinou kauzální léčbou u akutních ischemických mozkových příhod. I když počáteční náklady jsou vysoké, analýza poměru nákladů/užitku prokázala

jednoznačně velmi příznivou farmakoekonomickou bilanci (Cerebrovaskulární sekce České neurologické společnosti ČLS JEP 2014).

K dnešní trombolytické terapii se používá altepláza – rekombinantní tkáňový aktivátor plasminogenu (rt-PA), který nahradil dříve užívanou streptokinázu. Léčba intravenózní trombolýzou má četné kontraindikace, kam patří mj. věk <18 a >80 let, podezření na nebo nevyloučení intrakraniálního krvácení souběžně nebo anamnesticky, známá nebo suspektní hemoragická diatéza, velký chirurgický výkon nebo trauma nebo porod v posledních třech měsících, těžší trombocytopenie, antikoagulační terapie, a také pokud začaly příznaky příhody před 4,5 a více hodinami či doba vzniku není známa (během spánku). Intravenózní trombolýza je technicky poměrně jednoduchá, ale má malou účinnost (kompletní rekanalizace je dosaženo pouze u 18 % pacientů, 40 % pacientů zůstává upoutáno na lůžko či umírá). V těchto případech jsme odkázáni na konzervativní terapii (antiedematózní léčba, antikoagulační a antiagregační léčba, prevence vazospasmů, oxygenoterapie, udržení krevního tlaku a mozkového průtoku, výživa) a na léčbu a předcházení komplikací a následků (nootropika, prevence infekce, dekubitů, fyzioterapie, logopedie, následná péče a sociální péče s cílem udržení soběstačnosti pacienta). Evropské i americké studie se věnují vyhledávání cílové skupiny pacientů, kde se dá očekávat benefit intravenózní trombolýzy i při pozdějším podání (ECASS, European Cooperative Acute Stroke Study 1999), případně vývoji nových intravenózních trombolitik a intenzifikovaných terapeutických režimů (Furlan et al. 2006; Goldmund et al. 2008).

Jinou možností, využívanou v indikovaných případech, je intraarteriální trombolýza, sonolýza, invazivní trombolýza nebo trombektomie pomocí perkutánního intravenózně či intraarteriálně zavedeného katetru, který umožňuje mechanické odstranění trombu (Školoudík 2014).

Primární a sekundární prevence je zaměřena na odstranění rizikových faktorů a předcházení vzniku iktu u rizikových pacientů, případně na zamezení opakování příhody.

3.2. Modely ischemického iktu u zvířat

Modely mozkového infarktu u zvířat byly navrženy tak, aby co nejvíce respektovaly a simulovaly nejčastější mechanismus vzniku a lokalizaci a kopírovaly metabolické a patofyziologické pochody a změny. Požadavky na experimentální lézi dále zahrnují reprodukovatelnost, jednoduchost a co nejnižší zatížení zvířete při zákroku.

Dalším důležitým krokem je vybrat vhodný modelový organismus. Z hlediska anatomických a fyziologických poměrů, velikosti a handlingu, ošetrovatelské náročnosti, nákladů na chov a etických otázek se upřednostňují hlodavci – potkani, myši nebo pískomilové před primáty či psy. Pískomilové se navíc vyznačují anatomickou zvláštností – nemají vytvořen Willisův okruh a mozková ischemie je tedy indukovatelná podvazem i jedné karotidy.

Modely ischemické léze u zvířat využívají více postupů a dají se dělit do skupin dle operačního či chemického postupu, dopadu, trvání, rozsahu léze apod. K nejzákladnějšímu dělení patří:

- ischemie globální
- fokální, kdy můžeme vytvořit jedno ložisko (lokální) a víceložiskové (multifokální) léze.

Ke globálním ischemiím patří:

- krční turniket
- dekapitace
- indukovaná srdeční zástava (cardiac arrest)
- podvaz všech 4 přívodných tepen (4VO)
- podvaz 2 nebo 3 přívodných tepen s indukcí hypotenze (3VO, 2VO)
- s modifikacemi, kdy podvaz jedné tepny nebo tepen může být trvalý a zbylých tepen dočasný apod.

Mezi modely lokální ischemie patří:

- Modely s kraniektomií – podvaz a. cerebri mediae či anterior a endotelinem-1 indukovaná konstriktce a. car. mediae
- Bez kraniektomie: intraluminální okluze a. cerebri mediae, fototrombóza, fototrombóza s embolizací, embolizace jedním embolem vyššího průměru (jednolozisková ischemie) nebo mikroembolizace (multifokální ischemie). Vedle embolizace jsou možné ještě modely endovaskulární okluze příslušné tepny pomocí intraluminálně zaváděného filamenta.

Existují také modely spontánního iktu u speciálně šlechtěných modelových zvířat (spontánně hypertenzní potkaní, stroke-prone rats) (Tatlisumak a Fisher 2006).

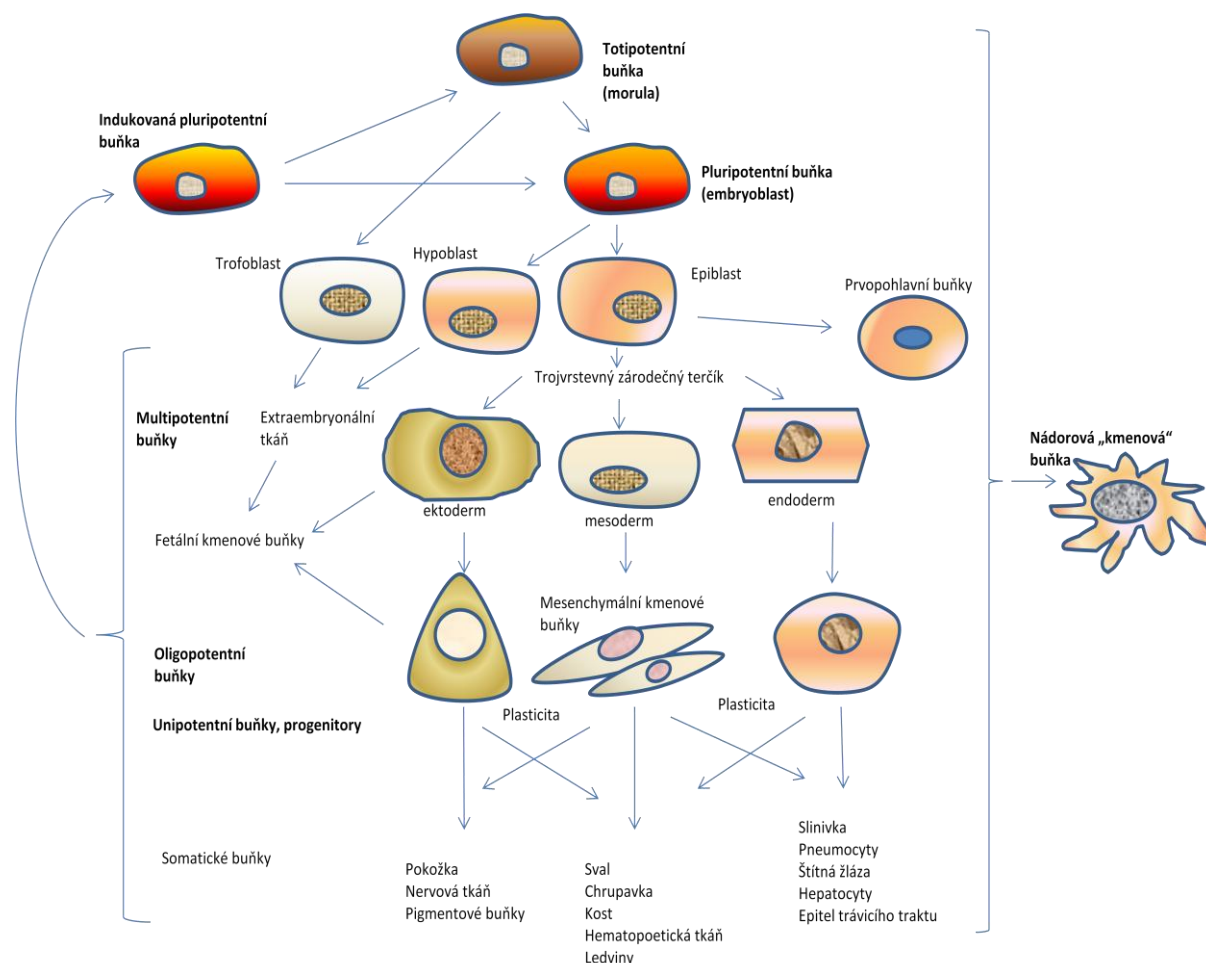
S výjimkou dekapitace mohou všechny ostatní modely působit dočasnou nebo trvalou ischemií, v závislosti na délce uzávěru tepen, embolizačním materiálu (biodegradabilním nebo neodegradabilním) (Ginsberg a Busto 1989; Tatlisumak a Fisher 2006).

Zvířecí modely slouží ke zkoumání rozsáhlého množství modalit souvisejících s etiologií, patofyziologií, diagnostikou, terapií a behaviorálními i kognitivními následky ischemického iktu. Velká část výzkumu a publikací je věnována vlastním modelům ischemického fokálního infarktu. První metodu uzávěry a. cerebri mediae bez kraniotomie s užitím intraluminálně zaváděného vlákna popsal Koizumi (Koizumi J. et al. 1986), který využil vlákno upravené potažením silikonem. Na něj navázal Longa (Longa et al. 1989), kde je řešena metodika dočasné intraluminální okluze a. cerebri mediae vláknem s tepelně upravenou špičkou. Další navazující práce se věnují dalším modifikacím, jako jsou různé úpravy vlákna potahováním dalšími látkami, jako je např. poly-L-lysin (Belayev et al. 1996), srovnání obou metod (Laing et al. 1993), nebo rozdíly ve výsledcích u stejné metodiky, ale u

různých odrůd laboratorního potkana (Duverger a MacKenzie 1988; Prieto et al. 2005) nebo u různého pohlaví (Carswell et al. 2000). Model embolického infarktu popisuje Penar (Penar 1987) využívající autologní koagulum, nebo i vzduch (Furlow 1982). Fototrombotickou lézi na podkladě podání fotosenzitivní látky a ozáření zdrojem světla nebo laserem uvedl Watson (Watson et al. 1985).

3.3. Buněčná terapie

3.3.1. Kmenové buňky



Obr. 6: Schéma vzniku kmenových buněk různých typů během vývoje jedince a jejich zdroje *in vivo* a *in vitro*. Jednotlivé typy buněk se mohou vývojově překrývat, hranice není ostrá (fetální buňky). Možnost vzniku totipotentních buněk z iPS byla popsána recentně (Abad et al. 2013), *in vivo* u myši po podání iPS. Nádorové kmenové buňky, stojící mimo fyziologický vývoj jedince, mohou nabývat všech úrovní „kmenovosti“ včetně totipotence nalezené v solidních tumorech ze zárodečné tkáně (van de Geijn et al. 2009).

Kmenové buňky jsou nediferencované nebo nízkě diferencované buňky, které mají potenciál vyvinout se ve většinu či ve všechny typy buněk, tvořících somatické tkáně (obr. 6). Kmenové buňky odlišují od ostatních buněčných typů dvě základní vlastnosti: 1) jsou to nespecializované buňky schopné sebeobnovy buněčným dělením, přičemž si dceřinné buňky zachovávají vlastnosti mateřské buňky,

často i po dlouhém období inaktivity, 2) za určitých konkrétních fyziologických nebo experimentálních podmínek mohou diferencovat do orgánově nebo tkáňově specifických buněk se speciálními funkcemi.

Schopnost kmenových buněk diferencovat do jednotlivých specializovaných typů nabývá různých úrovní: nejširší možnosti mají buňky **totipotentní**. Tyto buňky vyžívají v jakýkoliv typ tkáně včetně buněk plodových obalů a placenty a primordiální fetální tkáně. Tyto vlastnosti mají prakticky výhradně buňky zygoty. Zygota se dalším vývojem posouvá k blastocystě, kdy zde od 5. dne vývoje můžeme nalézt rozdělení do té doby rovnocenných buněk moruly na trofoblast (outer layer), která je základem pozdější placenty, a embryoblast (inner cell mass), který je základem pro další vývoj fétu. Buňky embryoblastu jsou **pluripotentní**, tj. dávají vzniknout všem typům buněk a tkání pocházejícím ze všech tří zárodečných listů, a jsou zdrojem pro derivaci embryonálních buněčných linií pro výzkum a potencionální klinické užití. Embryonální kmenové buňky se vyznačují neomezeným množením homogenní masy buněk bez vyžívání za specifických kultivačních podmínek – dodáváním cytokinu LIF (leukemický inhibiční faktor) do média k myším embryonálním buňkám (Dahéron et al. 2004), nebo různými kultivačními způsoby s tzv. feederem nebo ve feeder-free médiu obsahujícím např. transformující růstový faktor beta (TGF-beta) (Vallier 2011). První úspěšné izolace embryonálních kmenových buněk z myšího embryoblastu provedli Evans a Kaufman (Evans a Kaufman 1981) a Martin (Martin 1981) v roce 1981, lidské embryonální buňky byly izolované v roce 1998 Thomsonem a kolegy (Thomson et al. 1998). Problémem těchto buněk ovšem zůstává jejich omezený zdroj, imunologická inkompatibilita a v neposlední řadě etická otázka využití lidských embryí, proto je pozornost směřována na jiné zdroje buněk se stejnými vlastnostmi.

Buňky zachovávající si svůj nízký diferencovaný nebo nediferencovaný status můžeme nalézt během života jedince z různých tkání a orgánech. Přes svůj nespecifický fenotyp je možnost opakovaného dělení těchto buněk omezena a diferencují zpravidla pouze do takových specializovaných typů buněk, které vznikají z příslušného zárodečného listu – jsou **multipotentní**. Příkladem je diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk na adipocyty, osteoblasty a chondroblasty, tedy buňky pocházející se stejného zárodečného listu jako výchozí buňka – z mesodermu (Pittenger et al. 1999). Popsána byla změna fenotypu těchto buněk i směrem k odlišnému typu – do neuronálních buněk (Greco et al. 2007), hepatocytů (Ayatollahi et al. 2011; Wu a Tao 2012) či gliových buněk (Xu et al. 2011) procesem popisovaným jako transdiferenciaci či plasticita, přičemž plně funkční transdiferenciaci je stále předmětem výzkumu. Tyto buňky jsou v některých orgánech funkční součástí, kdy se kontinuálně dělí a nahrazují opotřebované a odumírající specializované buňky (střevo, kůže) či jsou základem pro růst a vyžívání tkáně (kostní dřev). Jinde jsou „silent“ populací, kdy dochází k aktivaci, dělení a vyžívání za specifických podmínek, jako je ischemizace či zánět (myokard, pankreas).

Somatické kmenové buňky nejsou homogenní skupinou buněk. Jde o poměrně rozdílnou skupinu

buněčných populací, které spojuje nízký diferenciální status a fenotyp omezený pouze na základní markery příslušnosti k určité buněčné populaci (CD34), případně tyto buňky nemají specifické markery žádné. Jejich schopnost diferenciace je omezena pouze na jeden buněčný typ, případně na několik typů, s výjimkou zatím příliš nepopsaných vSELs (very small embryonic-like stem cells). Takové buňky již můžeme spíše než za kmenové v tomto slova smyslu označit za **progenitory** (**oligopotentní** či **unipotentní** buňky) (Panchision et al. 2007). V současné době jsou buňky s kmenovými vlastnostmi izolované ze somatických tkání dospělého organismu popisovány a členěny takto: velmi malé kmenové buňky podobné embryonálním (very small embryonic-like stem cells – vSELs), neurální kmenové buňky (neural stem cells – NSCs), hematopoetické kmenové buňky (hematopoietic stem cells – HSCs), mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells – MSCs), epiteliální limbální kmenové buňky (limbal epithelial stem cells – LSCs), endoteliální kmenové buňky a progenitory (endothelial stem cells and endothelial progenitor cells – EpSC a EPCs), tukové stromální buňky (adipose-derived stem cells – ASCs), pericyty, kmenové nádorové buňky (cancer stem cells – CSCs) (tab. 2).

Tyto buňky je často nemožné odlišit jedním kmenovým markerem, protože exprese jejich markerů se často částečně překrývá mezi jednotlivými liniemi (Mabuchi et al. 2013) i následnými zralými formami (Crisan et al. 2008; Paul et al. 2012), navíc neexistuje přesná shoda, jaké markery by měly tyto buňky exprimovat (např. CD45, kde někteří autoři tento znak považují za klíčový, jiní naopak za vylučující pro kmenovou buňku, zejména v případě kmenových buněk hematopoetického původu, kam se přiřazují i endoteliální kmenové buňky, endoteliální prekursory a cirkulující endoteliální buňky (Khan et al. 2005). Navíc se mohou lišit některé vlastnosti a exprese markerů u shodných buněk, ale izolovaných z různých orgánů (Tárnok et al. 2010; Lv et al. 2014). Morfologická a funkční charakterizace buněk považovaných za odlišné typy kmenových buněk podporuje naopak hypotézu o shodném původu těchto buněk, kdy dochází k modifikaci fenotypu vlivem místa a prostředí, odkud jsou tyto buňky izolovány, ovšem základní vlastnosti multipotentní buňky, jako je schopnost dělení bez ztráty nezralých markerů a diferenciace do shodných typů zralé tkáně, nejsou dotčeny (Covas et al. 2008). Jiný problém představuje nedostatek znalostí o fenotypu a charakteristikách multipotentních buněk *in vivo*, kdežto fenotyp kultivovaných buněk *in vitro* je dobře znám a popsán (Pittenger et al. 1999; Conget a Minguell 1999; Dominici et al. 2006). V případě stromálních mesenchymálních buněk dochází po kultivaci ke změně exprese povrchových markerů, takže dobře popsán fenotyp kultivovaných buněk nelze pro prospektivní izolaci čerstvých MSC užít, navíc je v populaci “mesenchymálních prekursorů” z téhož zdroje možno identifikovat více subpopulací s různou expresí týchž markerů a s různou diferenciální kapacitou (Bühring et al. 2007, 2009; Battula et al. 2009). Toto jiné autory vede k názoru za MSC považovat pouze jeden typ z non-hematopoetické směsi kostní dřeně (Jones a McGonagle 2008) (tab. 3). Znaky popsané Dominicim (Dominici et al. 2006) a užívané jako základní kritérium identifikace MSC sdílí i fibroblasty z různých zdrojů (Alt et al. 2011).

Zkratka	vSEL	NSC	HSC		MSC	EpSC	LESC	EPC			ASCa	pericyty	CSC
Orgán/tkáň	Různé		Kostní dřeň	Dospělá játra	Dospělá játra	Dospělá játra	Oko	Periferní krev	Tuková tkáň	Dospělá játra	Tuková tkáň	Tuková tkáň	Tumory
Druh	Myš/člověk	Myš/člověk	Myš	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk	Člověk
CD11b (MAC-1)	–		–										
CD29	–	–	–		+	+							
CD31				–	–	–			+	+	–	–	
CD34		–	+/-	+	–	–	–	+	+	+	+	+/-	+
CD44	–		–										+
CD45	–	–	+	+	–	–	–	(+)	–		–	–	
CD49f					–	+							
CD56					+/-	+/-							
CD73					+	+							
CD81		+											
CD90 (Thy-1)	–			(+)	+	–			+	(+)	+	+/-	
CD105	–			–	+	–		+	+	+	–	+/-	
CD117 (C-kit)	–		+						–		–	–	+
CD118 (LIF-R)													
CD133		+		+	–	+	–	+		+			+
CD144 (VE-Cadherin)		+						+	+		–	–	
CD146		+		–	+	+/-			+/-	+	–	+	
CD166					+/-	+/-							
CD184 (CXCR4)		+						+					
EpCAM				–	–	+				–			
Nanog	+												
Nestin		+											
Notch-1		+											
Oct-4	+												
Sca-1 (myš)	+	–	+										
SSEA-4	+	+			+								
VEGF-R2 (KDR, Flk-1)				–	–	–		+	+	+			

vSEL – velmi malé kmenové buňky podobné embryonálním; NSC – neurální kmenové buňky; HSC – hematopoetické kmenové buňky; MSC – mesenchymální kmenové buňky; EpSC – epiteliální kmenové buňky; LESK – limbální epiteliální kmenové buňky; EPC – endoteliální progenitory; ASC – tukové stromální buňky; pericyty – tukové pericyty; CSC – nádorové kmenové buňky;

+ marker vyjádřen; (+) střední exprese; +/- nízká exprese; – marker neexprimován; prázdné pole – netestováno

Tab. 2: Vybrané negativní a pozitivní povrchové a intracelulární markery detekované průtokovou cytometrií na kmenových somatických buňkách různého původu. Upraveno dle (Tárnok et al. 2010)

Markery MSC	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
CD34	+	-
CD45	+/-	-
CD56	++/-	-
CD73	++/-	+++
CD90	+++	+++
CD105	+/-	+++
CD133	+	-
CD146	++/-	+/-
CD271	+++	-
MSCA-1	+++/-	+++/-
HLA-I	+/-	+++
HLA-DR	+/-	-

Tab. 3: Povrchové markery mesenchymálních buněk se liší při čerstvé izolaci (Bühring et al. 2007), (Khan et al. 2005) a po kultivaci *in vitro* (Pittenger et al. 1999). V rámci MSC čerstvě izolovaných je možno identifikovat subpopulace lišící se např. expresí CD73, CD90 a CD105, které Young a Black nazývají mesenchymální kmenové buňky (pluripotentní, CD90+, CD105-) a mesenchymální progenitory (multipotentní, CD105+, CD73+) (Young a Black 2004), je možno najít subpopulace lišící se úrovní exprese CD271, MSCA-1 a CD56 s různou schopností tvořit kolonie (CFU-F) a různou diferenciací kapacitou (Bühring et al. 2009); liší se exprese jednotlivých znaků u buněk izolovaných z různých tkání, zejména CD146, CD271 a MSCA-1 (Crisan et al. 2008; Lv et al. 2014), jiní autoři (Jones a McGonagle 2008) za pravé MSC považují pouze buňky s vysokou expresí CD271 a ostatní nehematopoetické buňky s vlastnostmi MSC popisují jako retikulární buňky. Symboly: – negativní, +/- proměnlivá exprese, + slabě pozitivní, ++ středně pozitivní, +++ silně pozitivní. Klasifikace podle Dental pulp stem cells: phenotypic changes according to culture conditions (Soukup 2007).

Fetální kmenové buňky pocházejí přímo z vyvíjejících se fetálních orgánů nebo z podpůrných fetálních tkání (amnion, placenta, pupečník). Fetální kmenové buňky jsou popisovány jako multipotentní, ovšem s mnohem vyšší plasticitou, založenou na odlišné genové expresi během vývoje plodu. Popisují se jako buňky na přechodu od embryonálních buněk k buňkám dospělým v závislosti na stáří plodu, kdy prvotrimestrální somatické buňky vykazují markery typické pro embryonální buňky, mají delší telomery a aktivnější telomerázu a vyšší proliferační kapacitu, přičemž s pokračujícím vývojem nabývají charakteristik svých dospělých protějšků (Guillot et al. 2007; Abdulrazzak et al. 2010) (tab. 4). První popsané fetální kmenové buňky byly hematopoetického původu, izolované z pupečnickové krve, v roce 1970 u myši (Barker 1970) a v roce 1974 u člověka

	embryonální kmenové buňky	fetální tkáň			extraembryonální tkáň						dospělá BM- MSC
		krev	játra	kostní dřeň	pupečnicková krev	Whartonův rosol	plodová voda	amniální epitelové buňky	amniální MSC	choriové MSC	
fenotyp (s)	E	MSC/H	MSC/H	MSC/H	MSC/H	MSC	MSC/AFS/VSEL	EP	MSC	MSC	MSC
doba zdvojení (DT)/ zdvojení populace (PD)	48–24 h (DT)/ neomezené (PD)	21.9 ± 1.1 h (prvotrimestrální MSC) (DT)/28.4 (PD)	46 h (druhotrimestrální MSC) (DT)	32 h (druhotrimestrální MSC) (DT)	39–43 h (DT)/20 (PD)	85–11 h (DT)	25–38 h (druhotrimestrální MSC) 36 h (AFS) (DT)/66 (MSC)/přes 250 AFS (PD)	38.4 h (DT)	30 (PD)	21.25 ± 3.2 h (DT)/30	54–111 h (DT)/7.1 (PD)
potřeba feederu/matrigelu	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
„kmenovost“	P	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	M
Oct-4	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	±
Sox2	+++	n.d.	n.d.	n.d.	+		–	+	n.d.	n.d.	±
Nanog	+++	++	++	++	+	+	±	+	n.d.	+	±
SSEA-4	+++	++	++	++	+	+	+	+	–	+	–
Tra-1-61	+++	++	++	++	n.d.	+	±	+	–	+	–
délka terminálních restrikčních fragmentů/aktivita telomerázy	+++	++	++	++	++	+	n.d.	–	n.d.	+	–
alkalická fosfatáza	+++	n.d.	n.d.	++	+	+	+	–		n.d.	±
MHC I. třídy	+ (nízké)	+ (nízké)	+ (nízké)	+ (nízké)	+	+	+	+ (nízké)	+ (nízké)	+	+
MHC II. třídy (HLA-DR)	–	–	–	–	±	–	±	–	–	–	–
tvorba teratomů v imunodeficitních myších	ano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ne	ne	n.d.	n.d.	ne

Tab. 4: Tabulka srovnání vybraných vlastností různých typů kmenových buněk. AFS, amniální kmenové buňky, E, embryonální; MSC, mesenchymální; H, hematopoetické; EP, epitelální; VSEL, velmi malé podobné embryonálním; P, pluripotentní; M, multipotentní; U, unipotentní; n.d., nestanoveno (not determined). Upraveno dle (Abdulrazzak et al. 2010).

(Knudtson 1974). U plodu jsou významným zdrojem těchto buněk kromě pupečníku ještě tkáň žloutkového vaku, fetální játra a zakládající se kostní dřeň, v prvním trimestru jsou tyto orgány významným zdrojem fetálních mesenchymálních buněk. K dalším zkoumaným buněčným typům fetálního původu patří epitelové tkáň, fetální endotelie a neurální prekursor (O'Donoghue a Fisk 2004). Problémem je nedostatečné množství buněk potřebných ke klinickému užití. Pro vypěstování dostatečného množství buněk je tedy vyžadována manipulace. Příkladem je lidská imortalizovaná linie CTX0E03 derivovaná z fetálního kortexu sedmitýdenního plodu, kde byl vnesen konstrukt c-mycER^{TAM}-GFP a totožná linie SPC-01 z neuroepitelu zakládající se krční míchy (Pollock et al. 2006), nebo linie s prodlouženou životností derivované z amniálních mesenchymálních lidských buněk iHAM obsahující konstrukt hTERT, bmi-1 a HPV16 E6 nebo E7 geny (Teng et al. 2013).

Buňky s vlastnostmi kmenových buněk byly *in vivo* popsány kromě vývojových stadií zárodku a zdravých somatických tkání také v tumorech různého původu, přičemž otázka jejich zdrojů není zcela vyřešena, uvažuje se o perzistujících embryonálních či fetálních buňkách s kmenovými charakteristikami, které jsou výchozím zdrojem pro vývoj nádoru (Sutter et al. 2007), některé nálezy by však svědčily pro vývoj stem cell-like buněk přímou dediferenciací tumorových buněk z vyšší vývojové úrovně (Wang et al. 2008). Kmenové buňky byly nalezeny v glioblastomech (Dirks 2008), v tumorech střeva (Leedham a Wright 2008), prsu (Wijaya et al. 2011) či pankreatu (Takao et al. 2012). V onkologii jsou místo za terapeutický faktor považované za zdroj tumorigeneze, jsou uvažovány jako faktor rezistence k chemo- a radioterapii a metastazování nádoru a jejich eradikace je klíčová k úspěšnému léčení onkologického onemocnění (Tang et al. 2007). V experimentu byly vyvinuty a používány neurální buňky derivované z teratokarcinomu diferencované do postmitotických neuronů (Andrews et al. 1984; Pleasure et al. 1992).

Nejnovějším, experimentálně vzniklým typem pluripotentní buňky, jsou indukované pluripotentní buňky (iPS), představené poprvé v roce 2006 Takahašim a Jamanakou (Takahashi a Yamanaka 2006), kdy byly poprvé připraveny indukované pluripotentní buňky z myších fibroblastů, o rok později stejní autoři uvedli lidské indukované pluripotentní buňky (Takahashi et al. 2007), v roce 2012 dostal Š. Jamanaka za tento objev Nobelovu cenu. Indukované pluripotentní buňky (iPS) vykazují charakteristiky vlastní embryonálním buňkám (neomezený počet dělení, pluripotentní fenotyp, schopnost *in vitro* diferenciaci do buněk pocházejících ze všech tří typů zárodečných vrstev, nediferencované iPS po implantaci do zvířete tvoří nádory (Kawai et al. 2010). IPS mohou být vytvořeny z vlastních tkání pacienta, čímž se odbourá imunologická bariéra přípravou autotransplantátu, a v neposlední řadě nedochází k etickým sporům spojených s použitím embryonálních či fetálních buněk, kontroverzní však zůstává jejich status GMO. IPS byly vytvořené retrovirovou transdukcí, kdy je do somatických buněk vnesen plasmid obsahující pluripotentní geny. Jiné způsoby zahrnují transfer jádra somatické buňky do bezjaderného oocyty, buněčnou fúzi,

případně, při snaze vyhnout se manipulaci s DNA, inkubaci s membránu penetrujícími transkripčními faktory. Jiné metody zahrnují použití jiného virového vektoru, např. adenovirů, jejichž DNA se neinkorporuje do genomu cílové buňky, případně transfekce (Pfannkuche et al. 2010). Firmy dnes nabízejí ucelené programy na vývoj a expanzi pluripotentních buněk, jako je např. Stemgent využívající buněčný reprogramming pomocí vnášené mRNA (Stemgent 2014).

3.3.2. Buněčná terapie, mechanismus účinku

Myšlenka terapie kmenovými buňkami vychází z potřeby nahrazení (**replacement**) defektních či chybějících buněk zejména v těch orgánech, kde je sebeobnova daná regenerativními možnostmi tkáně či orgánu minimální, což se týká zejména tkání a orgánů neurálního základu (nervový systém, oko) či je defekt natolik devastující, že přirozené mechanismy organismu nedostačují či jsou narušeny (pokožka, kosti). Zde se očekává přijetí buněk hostitelským organismem, jejich dlouhodobé přežití a funkční zapojení.

Druhým mechanismem účinku buněčné terapie je využití trofických vlastností buněk a jejich vliv na okolní tkáň, přičemž efekt může být pouze dočasný a dlouhodobé přežití či diferenciaci buněk nejsou nezbytným požadavkem (**rescue**). Transplantace různých kmenových buněk zvyšuje obsah aktivních molekul v postižené tkáni, poměr a zastoupení se liší v závislosti na typu buněk, kdy se produkce trofických látek objevuje i po transplantaci neurálních prekursorů, od kterých je spíše očekáván efekt nahrazení než regenerace (Hawryluk et al. 2012). Mesenchymální stromální buňky z různých zdrojů jsou známé svou produkcí nejrozličnějších bioaktivních makromolekul, které pomáhají vytvořit regenerativní mikroprostředí v postižené tkáni, působí imunosupresivně a imunoregulačně. Mezi produkované látky patří vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor beta (betaFGF), interleukin 6 (IL-6), monocytární chemoatrakční protein 1 (MCP-1) (Wu et al. 2007), faktor stimulující granulocytové kolonie (G-CSF), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), faktor stimulující kolonie monocytů (M-CSF), interleukin 11 (IL-11), LIF (Majumdar et al. 1998), kdy se mesenchymální buňky účastní inhibice apoptózy v místě postiženém ischemií, brání jizvení podporou angiogeneze a zvyšují regeneraci stimulací mitózy (Caplan 2009). V regeneraci nervového systému se uplatňují produkci z mozku derivovaného neurotrofického faktoru (BDNF) a nervového růstového faktoru beta (betaNGF) (Crigler et al. 2006).

Citované jsou i imunologické vlastnosti mesenchymálních kmenových buněk. Často diskutovanou vlastností mesenchymálních kmenových buněk je zapojení do T-buněčné odpovědi cestou zvýšení počtu a aktivace T-regulačních lymfocytů (Treg), což vede k potlačení aktivity CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů (Tasso et al. 2012) potlačením vyžívání Th1 a Th17 do efektorových buněk (Engela et al. 2012). Tlumení zánětlivé odpovědi se uplatňuje během vyžívání efektorových forem, ne později, přičemž samy allogenní MSC unikají rozpoznání cytotoxickými lymfocyty (Rasmusson et al. 2003).

Mezi další vlastnosti patří ovlivnění dalších typů buněk, jako jsou dendritické buňky (DC) (MSC produkují prostaglandin E2 (PGE-2) blokující vyzrání DC (Spaggiari et al. 2009), snižují vystavení kostimulačních molekul CD40, CD80, HLA-DR, snižují produkci tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-alfa) a IL-12 (Zhang et al. 2004), zvyšují produkci inhibičního IL-10), MSC potlačují vyzrání B-lymfocytů do plazmatických buněk a snižují expresi chemotaktických receptorů (Corcione et al. 2006), potlačují aktivaci NK-buněk, potlačují produkci INF-gamma, snižují jejich cytolytickou aktivitu (Spaggiari et al. 2008), exprimují a uvolňují HLA-G (Selmani et al. 2008), vykazují CCL2 antagonismus (Stagg a Galipeau 2013), produkují galektiny, NO syntázu (iNOS) a indoleamin-2,3-dioxygenázu (IDO) (Molendijk et al. 2012), k dalším produkovaným látkám patří TGF-beta, hepatální růstový faktor (HGF), přičemž imunomodulační působení je komplexní, buňky využívají i přímou interakci (Krampera et al. 2003). Tato vlastnost umožňuje užívat MSC jako terapeutické agens v terapii reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), autoimunitních a zánětlivých onemocnění jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, autoimunitní hepatitida a roztroušená skleróza (Griffin et al. 2010; ClinicalTrials.gov 2013), včetně zánětlivé fáze ischemického iktu (Chopp et al. 2008; Tuttolomondo et al. 2009).

Humorální vliv implantovaných neurálních prekursorů (NPs) na tkáň CNS je prokázán v potkaním modelu Parkinsonovy choroby, kde byla potvrzena mobilizace endogenních prekursorů, neurogeneze a migrace do místa léze, kdy transplantované buňky působí produkcí růstových faktorů (dle typu NSC a NPs zejména BDNF, neurotrofický faktor derivovaný z gliových buněčných linií – GDNF, faktor derivovaný ze stromálních buněk – SDF-1, faktor kmenových buněk – SCF a Sonic hedgehog – Shh) (Madhavan et al. 2009; Carletti et al. 2011), přičemž pro efekt není vyžadován přímý buněčný kontakt (Yasuhara et al. 2006), dále stimulují novotvorbu a prorůstání hostitelských axonů po transplantaci NPs do míchy (Yan et al. 2004). Transplantované NPs mohou navozovat apoptózu prozánětlivých Th1 a Th17 lymfocytů vystavením receptorů buněčné smrti na membráně (Hackett et al. 2014). Tento mechanismus je spouštěn prozánětlivými cytokiny (IFN-gamma, IL-1 β a TNF-alfa), ale ne protizánětlivými (IL-4, IL-5 a IL-13). NPs dále alterují s funkcemi dendritických buněk, kdy snižují počty specifických DCs v myším modelu roztroušené sklerózy (Pluchino et al. 2005). Podobně jako mesenchymální buňky umí také NPs produkovat iNOS a prostaglandin E2 (Wang et al. 2009).

3.3.3. Zdroje buněk pro buněčnou terapii

Prvním z nich je mobilizace vnitřních zdrojů. Somatické kmenové buňky se vyskytují řídce v celém organismu, chovají se různě v závislosti na hostitelské tkáni a většinou se aktivují za patologických stavů (viz výše). Mobilizovaných endogenních prekursorů z kostní dřeně se využívá v diabetologii v terapii ran nebo diabetické nohy (Liu a Velazquez 2008; Fiorina et al. 2010), v oftalmologii v léčbě

poškození sítnice (Machalińska et al. 2011), v plicním lékařství v terapii plicní dysplasie (Tropea et al. 2012), nebo v kardiologii (Templin et al. 2011), kdy snaha o mobilizaci zahrnuje jak zdroje buněk v poškozeném orgánu (myoblasty), tak mimo orgán (endotelie, kostní dřeň) (Dengler a Katus 2002). Mezi nejčastější způsoby mobilizace vnitřních zdrojů kmenových buněk se používá G-CSF buď samotný (Watanabe et al. 1999; Urdziková et al. 2006; Zimmet et al. 2012) nebo v kombinaci s Flt-3 (Urdziková et al. 2011), BDNF (Ming a Song 2011), parathormon, C-C chemokinový ligand 11 (CCL11), Wnt, TGF-beta, INF-gamma (Wagers 2012), epidermální růstový faktor (EGF), VEGF, FGF-beta, inzulínu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), erythropoetin (Luo 2011), analog G-CSF filgrastim (Neupogen®, Leucostim®) (Jungebluth et al. 2011) nebo antagonistu C-X-C chemokinového receptoru 4 (CXCR4) plerixafor (AMD3100) (De Clercq 2003; Broxmeyer et al. 2005; Pusic a DiPersio 2010; Kumar a Ponnazhagan 2012; Worel et al. 2012).

V nervovém systému se nacházejí neurální prekursorové buňky, které byly nalezeny v dospělém mozku a míše (Altman 1962) i u seniorů (Goldman 2004; van den Berge et al. 2011; Ming a Song 2011; Saha et al. 2012). Neurální prekursorové buňky byly prokázány v celém nervovém systému, avšak některé oblasti mozku jsou významně vysokou koncentrací těchto endogenních progenitorů, jako je subventrikulární zóna postranní komory (SVZ) a gyrus dentatus (DG) hipokampu, kde byly prokázány již v šedesátých letech 20. století (Altman a Das 1965; Kim a Sun 2012). Snaha nalézt účinné prostředky k jejich mobilizaci je předmětem výzkumu, používají se látky zmíněné výše, jako je EGF (Cantarella et al. 2008) nebo bFGF (Jin-qiao et al. 2009) či preparáty založené na bázi hormonů, jako je allopregnanolon (Brinton a Wang 2006). Zvýšená exprese sox2 pozitivních prekursorů byla prokázána v hipokampu po elektrokonvulzivní terapii (Segi-Nishida et al. 2008), kdy i další látky jako inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu byly spojeny se zvýšeným objemem hipokampu a nálezem vyššího množství nesteminalních buněk (Jhaveri et al. 2010). Terapie využitím endogenních prekursorových buněk je jednou z nadějných léčebných modalit i u mozkové ischemie (Borlongan a Hess 2006; Shen et al. 2010), kdy je možno využít k jejich mobilizaci i jiný typ kmenových buněk, zejména mesenchymální stromální buňky z kostní dřeně či celou buněčnou frakci, kde se kmenové buňky vyskytují (Yoo et al. 2008; Chopp et al. 2009; Nakano-Doi et al. 2010). Významnou stimulací je trénink a fyzické cvičení (van Praag et al. 1999; Creer et al. 2010).

Druhou skupinou je transplantace exogenních buněk. Exogenní buňky, na rozdíl od endogenních zdrojů, jsou izolovány z dárcovského organismu a mohou být *ex vivo* pro terapeutické účely zpracovány způsoby, který dosud endogenní zdroje nenabízejí (od prostého promytí přes kultivaci a expanzi *in vitro* k podstatným manipulacím, jako je genetická modifikace a diferenciací do žádoucího funkčního typu buněk zmíněná u iPS, viz dále). Máme na výběr transplantaci autologní, allogenní, nebo xenogenní. Největší výhodou autologní transplantace je plná imunologická kompatibilita.

V případě mesenchymálních stromálních buněk se ukazují jako možný zdroj i allogenní buňky, neboť MSC vykazují nízkou imunoreaktivitu, jsou hypoimunogenní (Jacobs et al. 2013).

Allogenní transplantaci kmenových buněk volíme v případě, kdy autologní transplantát není možný, zejména v případě nedostatečného interního zdroje, nebo když není možné odebrat dostatečné množství buněk bez rizika poškození pacienta (polytrauma).

Xenogenní transplantace je běžnou praxí v experimentu, kdy zvířecí model dostává lidské buňky. V humánní medicíně je okrajovou záležitostí, která proběhla pouze v ojedinělých experimentech, kdy byly pacientům s neurodegenerativní chorobou implantovány fetální neurální buňky z prasete (Fink et al. 2000; Schumacher et al. 2000; Barker et al. 2000), prasečí buňky byly také podány malé skupině pěti pacientů s ischemií v oblasti bazálních ganglií (Savitz et al. 2005). Další možností je transplantace prasečích ostrůvků (Samy et al. 2014).

3.4. Klinické studie

Po světě aktuálně běží několik klinických studií, které se zabývají použitím mesenchymálních kmenových buněk v léčbě iktu u lidských pacientů. Používají se *in vitro* kultivované, autologní (studie ISIS, Grenoble, Francie; STARTING-2, Soul, Jižní Korea) nebo allogenní (Ex Vivo Cultured Adult Allogenic MSCs in Ischemic Cerebral Stroke, Stempeutics Research Pvt Ltd, Malajsie) buňky podávané intravenózně. Jiné studie využívají autologní, nekultivované CD34+ buňky kostní dřeně (Autologous Bone Marrow Stem Cells in Middle Cerebral Artery Acute Stroke Treatment, Španělsko), které ovšem zahrnuje i hematopoetické progenitorové buňky, podobně jako studie (Intercerebral implantation of allogenic CD34+ stem cells, Čína), kde se jako jedna z mála využívá ne intravenózní, ale intracerebrální podání.

Další studie využívají jiné typy buněk, jako jsou olfaktorické glie (Implantation of Olfactory Ensheathing Cells (OECs), China Medical University Hospital, Čína), mesenchymální buňky získaných z jiných zdrojů, jako autologní mesenchymální buňky z pupečnickové krve u dětí s perinatální ischemií (PediStroke, Houston, USA) nebo z tuku (Study to Assess the Safety and Effects of Autologous Adipose-Derived Stromal Cells in Patients After Stroke, Instituto de Medicina Regenerativa, S.A. de C.V., Tijuana, Mexiko). Mobilizace endogenních zdrojů pomocí filgrastimu je využita ve studii STEMOTHER (Jekatěrinburg, Ruská federace) (ClinicalTrials.gov 2014). Imortalizované neurální prekursor CTX0E03 jsou využívány v klinické studii PISCES-I (Pilot Investigation of Stem Cells in Stroke, fáze I.) a PISCES-II (fáze II.) (ReNeuron Ltd./K. Muir, Glasgow, Velká Británie, <http://www.reneuron.com/clinical-trials>).

V České republice běží momentálně nebo je schváleno (rok 2015) pět studií zabývajících se podáním dospělých kmenových buněk, z toho jedna v terapii GvHD, tři ortopedické a jedna neurologická (Autologní mesenchymální buňky kostní dřeně v léčbě amyotrofické laterální sklerózy, AMSC-ALS-001, BioInova a FN Motol). Podáním jiných buněk než adultních a v terapii iktu se v ČR žádná studie nezabývá (SÚKL 2015).

Primárními cíli studií jsou stanovení bezpečnosti a snášenlivosti podaného produktu, stanovení bezpečné dávky, vytipování cílové skupiny pacientů, pro niž bude mít buněčná terapie nejvyšší přínos, a v neposlední řadě zhodnocení terapeutického přínosu na stav pacienta.

3.5. Značení buněk a sledování *in vivo*

V experimentu jsou nejčastěji využívanou metodikou pro zhodnocení osudu podaného materiálu mikroskopické techniky po usmrcení pokusného zvířete a histologickém a imunohistochemickém zpracování tkáně. Podané tkáně či buňky je možno značit specificky na konkrétní struktury (cytoskelet, povrchové markery, specificky druhové protilátky v případě xenotransplantátu), v experimentu můžeme jako zdroj buněk využít dárcovské GMO zvíře exprimující GFP (Hejčl et al. 2013). Jinou otázkou je sledování transplantovaného materiálu u žijícího organismu a v humánní medicíně, kde nejvýznamněji přicházejí ke slovu diagnostické zobrazovací metody. Protože podané buňky a hostitelská tkáň mohou mít stejnou denzitu či intenzitu signálu a ověření osudu pomocí invazivních technik (biopsie) je v případě např. neurální tkáně na rozdíl od transplantované kostní dřeně a následného vyšetření periferní krve neúměrné svou zátěží a potenciálně poškozující, při sledování osudu transplantovaných buněk se setkáváme se požadavkem na vizualizaci těchto buněk *in vivo* a při opakovaných vyšetřeních. Nejvhodnější technika pro zobrazování měkkých tkání (samotných buněk) a metoda s nejnižší zátěží subjektu je zobrazování magnetickou rezonancí (MRI).

Pro vyšetření pomocí MRI se jako kontrasty využívají látky, které zkracují relaxační časy zobrazovaných protonů vody. Zkrácením relaxačních časů dochází k zesílení T1- a zeslabení T2- váženého signálu v místě výskytu kontrastní látky. V současné době jsou na trhu dostupné četné produkty pro zobrazování pomocí MRI, které jsou v převážné většině založené na bázi paramagnetického gadolinia (Gd^{3+}). Samotné gadolinium je toxické a pro podání do organismu musí být upraveno ve formě ve vodě rozpustných chelátů a často je navázáno na další látky, které zesilují interakci s molekulami vody. Zatímco za paramagnetické vlastnosti je zodpovědná molekula gadolinia, za farmakokinetické vlastnosti zodpovídá ligand. Tyto nízkomolekulární preparáty jsou určeny pro intravenózní podání. Kontrastní látky cirkulují v krvi s nízkým přestupem do tkání a umožňují např. detekovat neovaskularizaci či porušení hematoencefalické bariéry. Poměrně rychle (v řádu hodin) se vylučují z těla ledvinami (Gadovist®, Magnevist®, Dotarem®, Omniscan®).

Specifické kontrastní látky (Primovist®, MultiHance®) se vychytávají v hepatocytech a hodí se tak jako specifická kontrastní látka pro zobrazování parenchymu jater.

K menšině patří jednodoménové superparamagnetické kontrastní látky založené na bázi železa (Resovist®, Feridex/Endorem®, Sinerem/Combidx®, Lumirem/Gastromark®). Tyto látky obsahující magnetit Fe_3O_4 či maghemit $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ jsou ve formě suspenze nanočástic o velikosti 2 – 300 nm (SuperParamagnetic Iron Oxide – SPIO nebo Ultrasmall SPIO – USPIO, případně SPIONs – SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles); významně zeslabují intenzitu v T2-váženém obrazu (Žižka a Válek 1996). V současné době není v České republice pro klinické použití schválená žádná superparamagnetická kontrastní látka. Na výzkumné bázi se pohybují kontrastní látky založené na bázi platiny nebo manganu. Byly vyvinuty i nanočástice gadolinia ve směsi s nanočásticemi železa (Shepherd et al. 1970) nebo titanu (Řehoř et al. 2011).

Zejména superparamagnetické kontrastní látky se osvědčily pro značení buněk. Superparamagnetické nanočástice způsobují lokální nehomogenity magnetického pole, které vedou k rozfázování magnetických momentů protonů (vody) difundujících v jejich okolí, což se projeví ztrátou signálu. Díky tomu dochází ke ztrátě signálu v oblasti nesrovnatelně větší, než je samotný rozměr nanočástice. Detekovat proto lze i struktury (např. superparamagnetickými nanočásticemi označené buňky), které jsou menší, než je rozlišení MR obrazu.

Kontrastní látky je možné upravit takovým způsobem, aby byly schopné cíleného transportu přes buněčnou membránu a směřovat je obalením či úpravou jejich velikosti na určitý typ buněk, při zachování jejich magnetických vlastností a nízké toxicity (Frank et al. 2004). Buňky takovým způsobem označené se na T2-váženém obraze zobrazují jako hyposignální místa – černé body. Obalené částice navíc vykazují vyšší stabilitu suspenze v roztoku. V experimentu byly takto vytvořeny SPIO částice obalené organickými polymery poly-L-lysinem (PLL) (Babic et al. 2008; Weis et al. 2013), poly(L-lactidem) (Schmidtke-Schrezenmeier et al. 2011), D-manózou (Horak et al. 2007) nebo cysteinem s kyselinou polyakrylovou (Vetter et al. 2011). K dalším obalovým materiálům patří anorganické kovy (zlato), oxidy (silika) a rozsáhlé spektrum bioaktivních molekul a ligandů (Gupta et al. 2007; Kievit a Zhang 2011). Tyto látky mohou být do cílového místa naváděny také pomocí aplikace vnějšího magnetického pole (Pouponneau et al. 2014).

Ferromagnetické kontrastní látky založené např. na manganu či na železe mohou mít i další využití a to jako intracelulární zdroj tepla. Vysokofrekvenční magnetické pole v důsledku hysterezních ztrát může nanočástice ohřát a vyvolat tak termoablaci (Pollert et al. 2010; Chen et al. 2011). Metoda je potenciálně zajímavá jako doplňková léčba nádorových onemocnění, protože k buněčné smrti nádorových buněk stačí nižší teplota než u buněk zdravých (Dietzel 1983; Hildebrandt et al. 2002; Silva et al. 2011).

Dalšími modifikacemi povrchu takových částic je navázání fluorescenční látky do obalu, která umožní přímé pozorování vychytávání a distribuce nanomateriálu v buňkách a tkáních pomocí fluorescenčního mikroskopu (Aspord et al. 2013; Řehoř et al. 2011).

Cílené nanočástice mohou sloužit jako vektor pro dodání látky do cílového orgánu či cílových buněk, kdy se na nanočástice navazují chemoterapeutika jako je idarubicin (Gunduz et al. 2014), přičemž mnohé z těchto částic mohou být i velmi komplexní, skládající se z magnetické partikule, cíleného ligandu či opsonizační látky (folát), léčiva (cisplatiny) a fluorescenční značky (Mohapatra et al. 2014). Spojením diagnostiky a terapie v jednom kroku se zabývá obor theranostika, v nanosvětě nanotheranostika.

4. Hypotézy a cíle práce

4.1. Hypotézy

- 1) Lidské indukované pluripotentní buňky jsou schopny diferenciaci do neurálního fenotypu *in vitro* shodně jako lidské embryonální buňky a představují tak nový zdroj pro buněčnou terapii při onemocnění a traumatech centrálního nervového systému.
- 2) Lidské mesenchymální buňky jsou schopny růstu s nezměněnými vlastnostmi i v médiu, kde je široce užívané fetální sérum nahrazeno allogenním lidským sérem.
- 3) Povrchové modifikace nanočástic založených na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ užívaných jako kontrastní látky pro MRI mění příjem nanočástic buňkou a mění její biokompatibilitu.

4.2. Dílčí cíle práce

- 1) Charakterizovat *in vitro* kulturu lidských embryonálních buněk a lidských indukovaných pluripotentních buněk, připravit dle odlišných protokolů *in vitro* kulturu lidských neurálních prekursorů a stanovit fenotyp buněk během pasáží.
- 2) Transplantovat buňky z jednotlivých pasáží a na základě výsledků charakterizace buněčného fenotypu a histologického vyšetření stanovit nejvhodnější vývojovou úroveň buněk pro úspěšné přežití transplantátu a vyloučení rizika vzniku tumoru.
- 3) Pomocí behaviorálních testů sledovat pokusná zvířata po transplantaci a kontrol a vyhodnotit přínos transplantovaných buněk pro zlepšení neurologických funkcí.
- 4) Srovnat různé typy kultivačních medií pro MSC pro vyhodnocení optimálních kultivačních podmínek a porovnat základní charakteristiku buněk (PD, tvorbu kolonií, přítomnost povrchových markerů a diferenciační potenciál)
- 5) Na *in vitro* kultuře MSC ověřit cytotoxicitu a genotoxicitu nově připravených nanočástic na bázi oxidu železa vhodných pro značení buněk.
- 6) Připravit bimodální kontrastní látku, která by umožnila nejen detekci buněk *in vivo* pomocí MR, ale následně i pomocí fluoresceinu v histologických preparátech.

5. Výsledky

5.1. Použití *in vitro* derivovaných lidských neurálních prekursorů v modelu iktu

Tato část práce je založena na těchto publikacích:

Kozubenko N, Turnovcova K, Kapcalova M, Butenko O, Anderova M, Rusnakova V, Kubista M, Hampl A, Jendelova P, Sykova E: Analysis of *in vitro* and *in vivo* characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant.* 2010;19(4):471-86. Epub 2009 Dec 18. IF 5.251

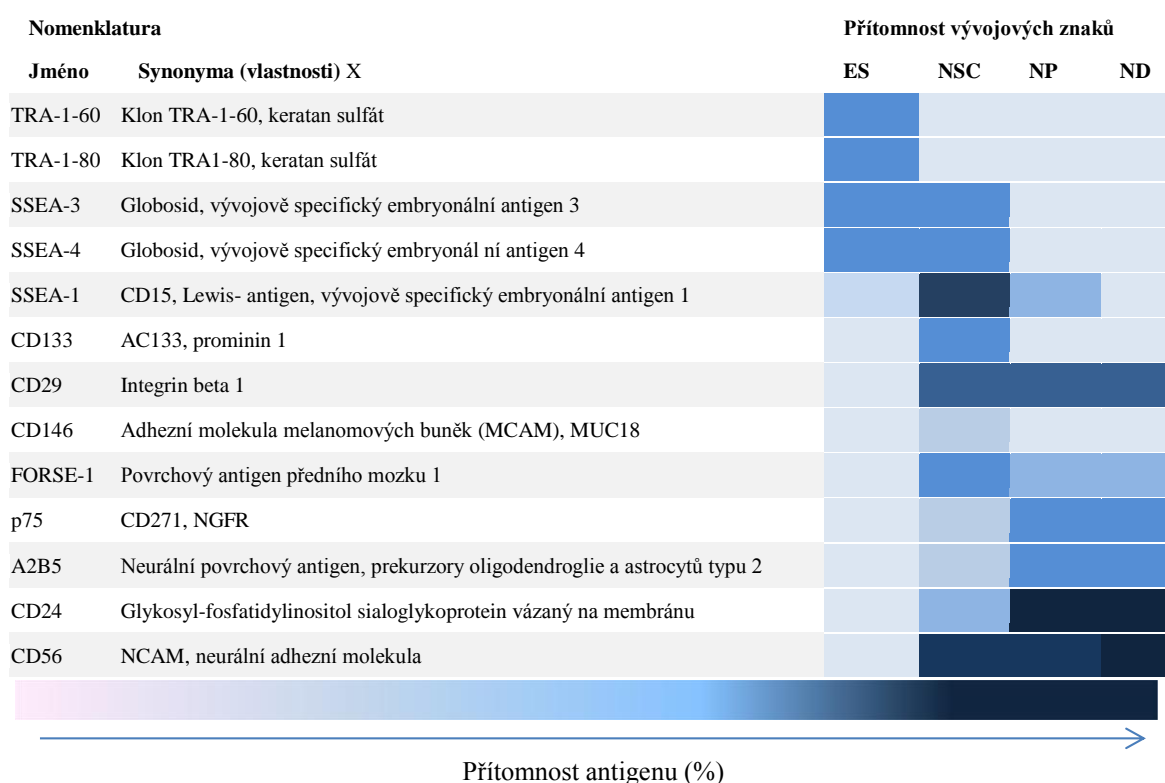
Polentes J, Jendelova P, Cailleret M, Braun H, Romanyuk N, Tropel P, Brenot M, Itier V, Seminatore C, Baldauf K, Turnovcova K, Jirak D, Teletin M, Côme J, Tournois J, Reymann K, Sykova E, Viville S, Onteniente B.: Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. *Cell Transplant.* 2012 Aug 10. IF 5.13

5.1.1. Úvod

Úspěšná transplantace neurálních či jiných buněk představuje jejich přežití ve tkáni a podle typu i diferenciaci, migraci a funkční zapojení. Klíčovým faktorem úspěšné transplantace neurální tkáně je věk dárcovské tkáně nebo odpovídající vývojový biologický věk tkáňové kultury žádoucích buněk, kdy tento rozvoj, růst a zrání probíhá. Všeobecně, zralé neurony z CNS přežívají transplantaci, jen pokud jsou odebrány z plodu či neonatálního jedince. Dospělé neurony z postnatálního mozku nepřežívají. Optimálního přežití graftu je dosaženo, pokud jsou donoři vybráni v takovém věku, kdy se odebíraná populace neurálních buněk nachází v období vrcholící neurogeneze. Tyto poznatky byly získány empiricky na počátku zájmu o neurální transplantaci a tkáňové kultury koncem 60. let 20. století (Tatlisumak a Fisher 2006). V případě snahy o vývoj *in vitro* modelů připravujících neurální prekursor pro transplantaci do živých soustav je zde tendence kopírovat či se co nejvíce přiblížit reálnému vývojovému stadiu neurálních buněk. V případě transplantace nízko diferencovaných nebo nediferencovaných embryonálních buněk nebo buněk s identickými vlastnostmi (iPS) dochází k vývoji tumorů (Seminatore et al. 2010; Kawai et al. 2010). Obecným předpokladem, jak se vyhnout tumorigenitě, je omezení buněčné proliferační kapacity, čehož dosáhneme diferenciací ke zralým formám buněk.

hESC prokázaly v mnoha studiích schopnost vývoje do všech hlavních neuronálních a gliálních subtypů: DOPAergní (Schulz et al. 2004; Hong et al. 2008), GABAergní a glutamátergní neurony (Li et al. 2009), astrocyty a oligodendroglie (Erceg et al. 2009). První představil indukované pluripotentní buňky užit v modelu iktu Kawai et al., kdy popsal tumorigenicitu nediferencovaných iPS se vznikem tumorózní tkáně vycházející ze všech tří typů zárodečných listů (Kawai et al. 2010), a Chen, který popsal behaviorální zlepšení po transplantaci iPS podaných subdurálně ve fibrinovém lepidle (Chen et al. 2010). Tyto indukované pluripotentní buňky mají schopnost se diferencovat do neurálního fenotypu (Kim et al. 2010; Jiang et al. 2011).

Úspěšná transplantace vyžaduje nejen optimálně zralé buňky, ale také co nejčistší homogenní kulturu bez příměsi nezralých buněk. Zkušenosti ukazují, že i neurální buňky je možné sortovat s využitím šetrného třídícího módu. Pro neurální buňky a jejich jednotlivá vývojová stadia je třeba vyvinout tabulky znaků podobných těm, které jsou sestaveny a využívány hematologi pro vývoj jednotlivých krevních elementů. Charakteristické znaky vyvíjejících se neurálních buněk využitelných pro třídění živých buněk zachycuje tab. 5 (Pruszek et al. 2007). Klíčem je nalezení a definování takového optimálního stavu vývoje buněk, kdy jsou buňky schopny přežít manipulaci mimo kultivační prostředí, přežít v hostitelském orgánu a vyvíjet se do požadovaných forem buněk, ovšem s vyloučením tvorby tumorů nebo hyperproliferace. Vývoji nejvhodnějšího protokolu pro neurální a neuronální diferenciaci optimálního pro určitý typ buněk je věnována všeobecně velká pozornost. Popisu a charakterizaci neurálních buněk, expresi povrchových markerů a vztah mezi schopností přežívat po transplantaci, proliferaci, migraci, udržení neurálního fenotypu a diferenciací *in vivo* je věnována následující část práce. V následném souhrnu představujeme protokoly pro přípravu neurálních a neuronálních buněk derivovaných z různých typů pluripotentních buněk a korelaci mezi jejich fenotypem a osudem transplantátu na různých úrovních vývoje.



Tab. 5: Tabulka povrchových znaků hESC-NPS na různých úrovních vývoje, vhodná pro třídění diferencujících se buněk *in vitro*. FORSE-1 – forebrain-surface-embryonic-1, ES – embryonální stadium (embryonic stadium), NSC – neurální kmenové buňky (neural stem cells), NP – neurální prekurzory (neural precursors), ND – neuronální diferenciacie (neuronal differentiation). Upraveno dle (Pruszek et al. 2007).

5.1.2. Metodika

5.1.2.1. Buněčné kultury

V experimentu byly použity lidské embryonální buňky (hESC) linie CCTL14 a lidské indukované pluripotentní buňky derivované z lidských fetálních fibroblastů – linie iMR90.

Linie **lidských embryonálních buněk CCTL14** (46, XX) pochází z Oddělení molekulární embryologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Brně. Nediferencované buňky byly pěstovány na feederu z fetálních myších fibroblastů (MEF) ošetřených mitomycinem-C na želatinou potažených kultivačních miskách. Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 obsahující 15 % FBS, 1 % neesenciálních aminokyselin, 2 mM L-glutamin, 0.1 mM β -merkapt ethanol, 4 ng/ml lidský rekombinantní fibroblastový růstový faktor (hrFGF) a penicilin/streptomycin. Buňky byly pasážovány každých 4 – 7 dní mechanicky pomocí škrabky nebo pomocí kolagenázy IV.

Neurální indukce (fáze I)

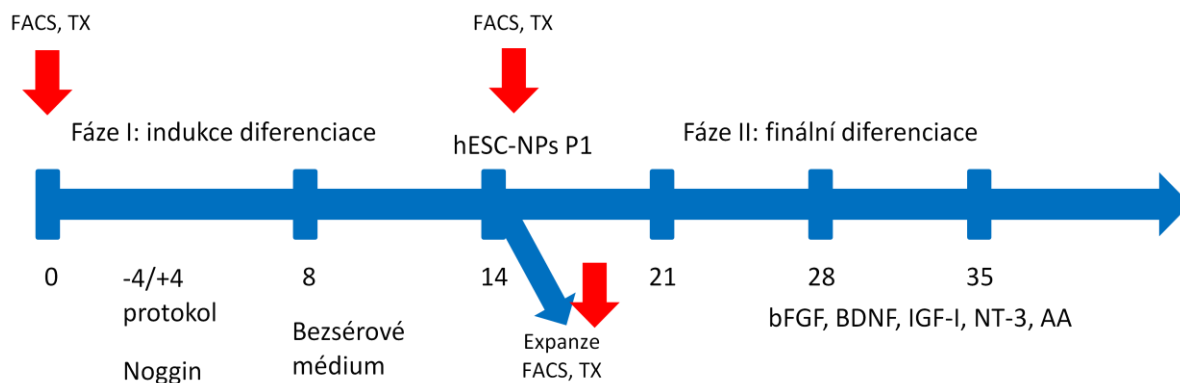
Kolonie nediferencovaných hESC byly přeneseny na misky s 0,1 % agarózou a kultivovány nejprve 4 dny v médiu bez přídavku hrFGF, potom 4 dny v médiu obsahujícím růstový a transkripční faktor noggin. Denně byla vyměňována polovina média. Po této době 70 – 90 % kolonií hESC vytvořilo tzv. embryoidní tělíska (EB). EB, které velikostí přesáhly 0,5 mm na průměru, byly rozděleny na menší kolonie a dále kultivovány v bezsérovém médiu (označené jako NPM) obsahujícím DMEM/F12 (1:1), B27 supplement (1:50), 2 mM L-glutamin, penicilin/ streptomycin doplněný 20 ng/ml lidského rekombinantního růstového faktoru (hrEGF) a 20 ng/ml hFGF. Buňky byly kultivovány dalších šest dní. Po dosažení tohoto bodu byly označeny jako neurální prekuzory (hESC-NPs) pasáže 1 (P1).

Pro účely dlouhodobé kultivace a expanze kultury byl hESC-NPs přeneseny na kultivační misky potažené lamininem a v NPM byly kultivovány dále s pasáží každých 5 – 7 dní. Pro účely hodnocení růstu a vyhodnocení fenotypu buněk jsme dosáhli celkem 15 následných pasáží. Jedna pasáž není vymezena přísně časově, je funkcí růstu kultury a odpovídá 3 – 5 dnům.

Finální diferenciací (fáze II)

Pro účely konečné neuronální diferenciací byly agregáty hESC-NPs umístěny na poly-D-lysinem (PDL)/lamininem potažená skla. hESC-NPs byl kultivovány v bezsérovém médiu s B27 (1:50), 2 mM L-glutaminem, penicilin/streptomycinem, 10 ng/ml hrFGF, 10 ng/ml neurotrofinu-3 (NT-3), dále 10

ng/ml BDNF, 1 ng/ml růstového faktoru podobnému inzulinu-1 (IGF-1) a 160 μ M kyseliny askorbové (AA) další 4 týdny (obr. 7). Médium bylo měněno každý druhý den.

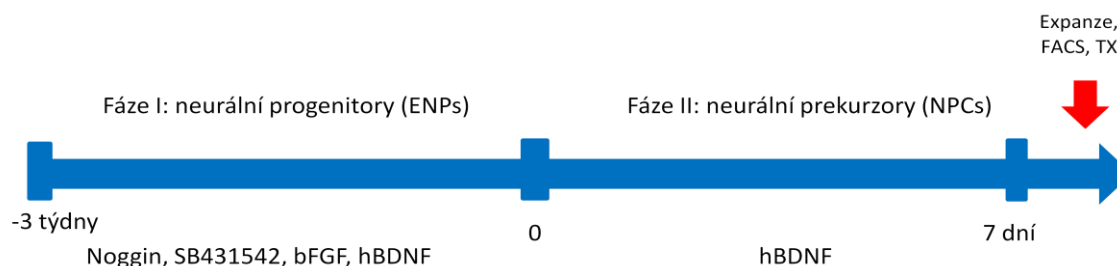


Obr. 7: Fáze indukce a diferenciace hESC-NPs. Červené šipky označují stadia vývoje, kdy byla provedena buněčná analýza a transplantace. TX – transplantace.

Linie **iPS buněk** byly vyvinuty ve laboratořích Cedex ve Štrasburku z lidských fetálních fibroblastů linie iMR90 (46, XX) (ATCC, Manassas VA, USA) vnesením konstruktů obsahujících geny Oct-4, Sox-2, Nanog a lin-28 pomocí virového vektoru (Yu et al. 2007) a takto připravené pluripotentní buňky byly dále pěstovány v laboratořích I-STEM, INSERM, Evry ve Francii. Transdukované buňky byly pěstovány nejprve v DMEM s 10 % FBS a poté přeneseny hESC média s přidávkem 20 ng/ml bFGF, kde byly pěstovány na feederu z myších fibroblastů (MEF). Jejich pluripotentní stav byl potvrzen na základě morfologického zhodnocení vytvářejících se kolonií, analýzy exprese vnesených genů, pluripotentního fenotypu a schopností vytvářet teratomy *in vivo*.

Neurální indukce a diferenciace

Indukované pluripotentní buňky byly přeneseny na kultivační média s přidávkem nogginu, transforming growth factor- β pathway inhibitoru SB431524, bFGF (10 μ g/ml) a lidského BDNF (20 μ g/ml). Takto získané buňky byly označeny jako neurální progenitory (early neural precursors – ENPs). Neurální prekuzory (NPC) byly diferencovány z časných neurálních prekuzorů další kultivací po dobu 7 dnů za přítomnosti hBDNF (20 μ g/ml) (obr. 8).



Obr. 8: Fáze diferenciace indukovaných pluripotentních buněk iMR90. Červená šipka označuje vývojové stadium, kdy byla provedena buněčná analýza a transplantace. TX – transplantace.

5.1.2.2. Imunocytochemie

Buněčné kultury rostoucí na sklech byly fixovány 4 % paraformaldehydem nebo 0,25 % glutaraldehydem. Pro barvení nediferencovaných hESC byl použit kit Human Embryonic Stem Cell Marker Antibody Panel (oct-3/4, nanog, TRA-1-60, sox-2, SSEA-4). Derivované hESC-NPs a hESC-NPs-derivované neuronální buňky byly značeny na synaptofysin, beta-III-tubulin, NF-160, GABA a glutamát, dále na Ki67. Diferencované hiPS-ENPs a hiPS-NPCs byly barveny na nanog, oct4, sox2, beta-III-tubulin, GFAP, pax6. Jádra byla vizualizována 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI). Obarvené buňky byly hodnoceny na konfokálním mikroskopu (LEICA TCS SP) a fluorescenčním mikroskopu Zeiss AXIO Observer.

5.1.2.3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Expresí povrchových a intracelulárních markerů nediferencovaných hESC a prediferencovaných hESC-NPs a hiPS-NPEs a hiPS-NPCs byla vyhodnocena pomocí průtokové cytometrie na přístroji BD FACSAria™.

Fenotyp lidských embryonálních buněk byl vyhodnocen ve stádiu nediferencovaných buněk, diferencované hESC-NPS byly sklizeny a hodnoceny během následujících pasáží P1 – P14. IPS-iMR90 byly sklizeny a vyhodnoceny pomocí průtokové cytometrie ve stádiu časných neurálních prekursorů (hiPS-ENPs) a neurálních prekursorů (hiPS-NPCs) v nejméně třech po sobě jdoucích pasážích. Všechny buňky byly pomocí příslušných protilátek značeny na nezralé intracelulární/jaderné markery oct3/4, sox-2, nanog, Ki-67 a povrchové markery SSEA-4 a TRA-1-60, intermediární znaky CD133, CD15 (SSEA-1), CD24, neurální znaky NCAM (CD56), CD29, PSA-NCAM, A2B5, CD271 (receptor pro nervový růstový faktor – NGFR) a cytoskeletální proteiny NF-70, nestin, beta-III-tubulin (Pruszk et al. 2007) a HLA-A, B, C a HLA-DR, DP. Každý buněčný typ a pasáž byly změřeny

minimálně třikrát. Pro stanovení exprese každého markeru bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk.

5.1.2.4. Zvířecí model

Všechny práce se zvířetem se řídí zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, ve smyslu § 17 tohoto zákona (ochrana pokusných zvířat), dále podléhá European Communities Council Directive z 24. listopadu 1986 (86/609/EEC) o využití pokusných zvířat, a je dále upravována Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

Model ischemického iktu

Vytvoření experimentální léze bylo provedeno metodou intraluminální okluze a. cerebri mediae (MCAo) bez kraniektomie. Pro experiment byl vybrán potkan Sprague-Dawley (Charles River) o hmotnosti 280 – 350 g. Zvíře bylo premedikováno atropinem (Atropin Biotika 0,5 mg/kg) a uvedeno do celkové inhalační anestézie (2 % isofluran, 2 % isofluran/30 % kyslík/75 % N₂O). Po ozřejmení nervově cévního svazku krčního vpravo a separaci n. vagus byly koagulovány a. thyroidea superior a a. occipitalis. Na a. carotis communis, a. carotis internae a a. carotis externae se nakládají svorky, které dočasně přeruší proud krve během zavádění okluzního vlákna. Do nástřihu na a. carotis externa bylo naloženo okluzní vlákno, které je zavedeno do a. carotis communis a z ní do a. carotis interna a dále do a. cerebri mediae. Délka zavedení vlákna se řídí velikostí zvířete, 11 – 16 mm od bifurkace a. carotis interna a externa. Utažením sutury na a. carotis externa se fixuje okluzní vlákno *in situ* a provede se dočasná sutura pokožky. Po 90 minutách zvíře opět uvedeme do celkové anestézie, okluzní vlákno šetrně odstraníme, uzavřeme pahýl a. carotis externa a po revizi rány provedeme definitivní suturu tkání a pokožky. Jako okluzní vlákno bylo využito chirurgické polypropylenové monofilové vlákno Prolene (Ethicon) o síle 4-0 (0,08 mm průměr) nastříhané na 2 cm dlouhé úseky. Špička byla cylindricky zesílena natavením a obalením tkáňovým lepidlem (3 mm délka, 0,24 mm průměr). Před zavedením se okluzní vlákno potahuje heparinem.

Medikace: butorfanol 2 mg/kg s. c. (Torbugesic a. u. v.), diazepam 3 mg/kg i. m. (Apaurin) v případě křečí, Hartmannův roztok a 10 % glukóza 1 ml i. p.

Implantace buněk

Implantace probíhala u vybraných zvířat 7 – 10 den po MCAo.

Potkan byl uveden do celkové anestézie 2 % isofluranem. Hlava zvířete byla upevněna do stereotaktického aparátu, po přípravě kůže a řezu ve střední čáře byla očištěna lebka a šupina os parietale byla provrtána pomocí vysokoobrátkové frézy, se zásadou neporušit nitrolební tkáň. Buňky byly stereotakticky implantovány Hamiltonovou mikrostríkačkou o objemu 10 μ l se špičkou jehly typ 2 (seříznutá v úhlu 12 °, mírně ohnutá dovnitř) přímo do místa léze (koordináty od bregmatu: laterálně 2 mm, kraniálně 0,5 mm, 5,5 mm do hloubky od povrchu tvrdé pleny). Bylo podáno 100 000 buněk vybraného typu v 2,5 μ l kultivačního média. Po pomalé implantaci byl trepanační otvor uzavřen kostním voskem, pokožka a podkožní tkáň sešity a zvíře ponecháno k zotavení pod dohledem ve vyhřívaném prostředí.

Bylo transplantováno celkem 49 zvířat hESC a hESC-NPs (tab. 6), 29 zvířat hiPS-NPCs iMR90, 35 zvířat bylo vybráno jako kontrola. 12 zvířat bylo ponecháno intaktních pro volumetrickou studii substantia nigra.

Z důvodu implantace xenomateriálu byla transplantovaným zvířatům podávána imunosuprese v trojkombinaci cyklosporin A (Sandimmun) 10 mg/kg i. p., azathioprin (Imuran) 4 mg/kg i. p. a metylprednisolon (Solu-Medrol) 2 mg/kg i. m. denně. Hmotnost zvířat byla pravidelně kontrolována a standardní krmná dieta potkanů byla podle potřeby doplňována nutriční podporou.

5.1.2.5. Behaviorální testy

Test s lepicí páskou

K jednoduchému testu využíváme papírové samolepicí etiketovací kolečko o průměru 12 mm. Toto kolečko se přilepí zespodu na dlaň a prsty přední levé packy zvířete, zvíře vrátíme do jeho chovné nádoby a měříme čas do sundání štítku (Freret et al. 2006). Testování druhostranné končetiny není nezbytné. Test nevyžaduje dlouhodobý nácvik. Potkani byli předtrénováni čtyři dny před operací, po zákroku byli testováni ve dnech 1 – 10 a poté třikrát týdně po celou dobu experimentu.

5.1.2.6. Magnetická rezonance (MRI)

Velikost léze a osud transplantovaných buněk byly sledovány metodou MRI. MRI scany byly pořízeny na přístroji 4,7 T – Bruker Biospec. Operovaná zvířata podstoupila první sken MRI první týden po operaci k verifikaci velikosti léze. MRI bylo opakováno v měsíčních intervalech pro zhodnocení vývoje ischemického ložiska a osudu transplantátu. Byla použita T2-vážená turbospin echo-sekvence (RARE). Parametry: repetiční čas (TR) = 3 ms, efektivní echo čas (TE) = 36 ms, turbo

factor = 8, počet akvizic (AC) = 8, field of view = 3,5 cm, matrix – 256 x 256 a tloušťka řezu 0,75 mm.

5.1.2.7. Zpracování tkání

Potkani byli uvedeni do celkové anestézie a perfundováni přes levou srdeční komoru solnofosfátovým pufrem a 4 % paraformaldehydem (PF, pH 7,4). Mozky byly po vynětí uloženy přes noc 4 % PF a poté mraženy 48 h v 30 % roztoku sukrozy. Na kryostatu byly poté připraveny řezy 40 µm. Takto připravené řezy byly pak barveny základními technikami (hematoxylin-eosin, kresylviolet k vyhodnocení morfologie tkáně) a imunohistochemicky. Bylo použito specifické barvení HuNu (barvicí specificky lidská jádra), MTC02 (lidské mitochondrie) k vizualizaci humánního materiálu v potkaním mozku, dále barvení na nestin, GFAP, dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32, k vizualizaci dopaminergních neuronů), Pax6, Ki67, nespecifická tyrosinhydroxyláza (TH), beta-III-tubulin, oct-3/4, NCAM, microtubule associated protein 2 (MAP2), neuron-specifická enoláza (NSE). Jádra byla barvena DAPI.

5.1.2.8. Statistické vyhodnocení

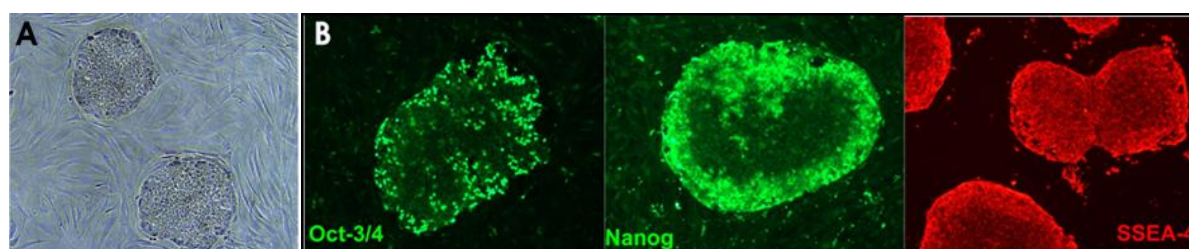
Data jsou vyjádřena jako průměry se směrodatnou odchylkou. Statistická analýza byla provedena v programu JMP (SAS). Za statisticky signifikantní byla považována hladina významnosti 0,05. Data byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA a Studentova t-testu.

5.1.3. Výsledky

5.1.3.1. Charakterizace pluripotentních kmenových buněk a *in vitro* derivovaných neurálních prekurzorů

hESC a hESC-NPs

Imunocytochemická analýza nediferencovaných hESC prokázala v koloniích embryonálních buněk vysokou expresi pluripotentního markeru oct3/4, který je lokalizován v jádře, dále transkripčního faktoru nanog a povrchového markeru SSEA-4 (obr. 9). Jednotlivé buňky byly pozitivní na SSEA-1. Nebyly nalezeny buňky exprimující NCAM, NF70, nestin nebo beta-III-tubulin.



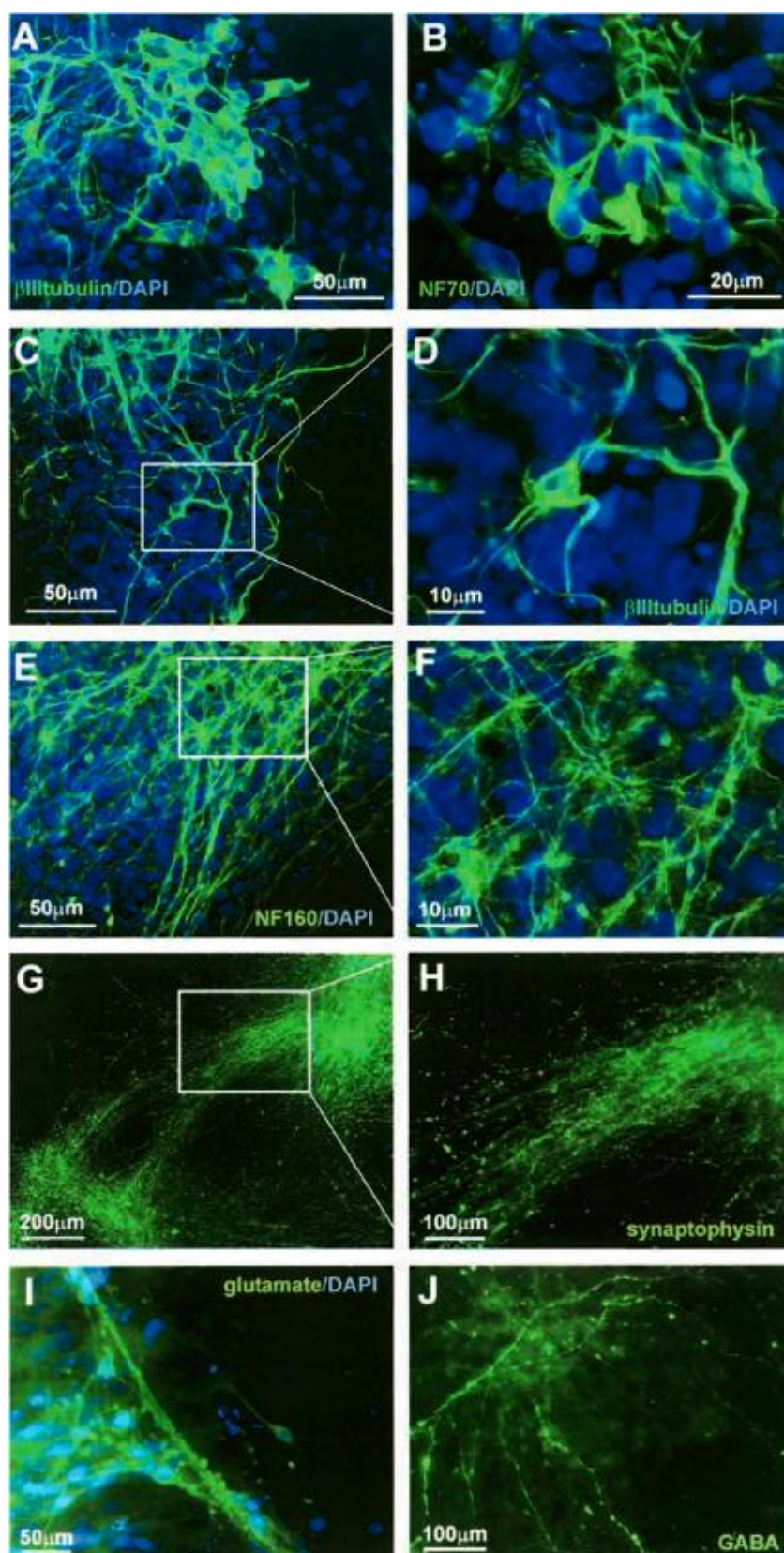
Obr. 9: hESC a hESC-NPs. Morfologie kolonií nediferencovaných hESC (A) a exprese nezralých markerů (B). Úroveň exprese jednotlivých markerů se liší v jednotlivých buňkách kolonií.

Ve fázi dvě (neuronální diferenciace) imunohistochemické barvení prokázalo buňky pozitivní na beta-III-tubulin, NF160, synaptophysin, glutamát a GABA (obr. 10).

Průtoková cytometrie (FACS)

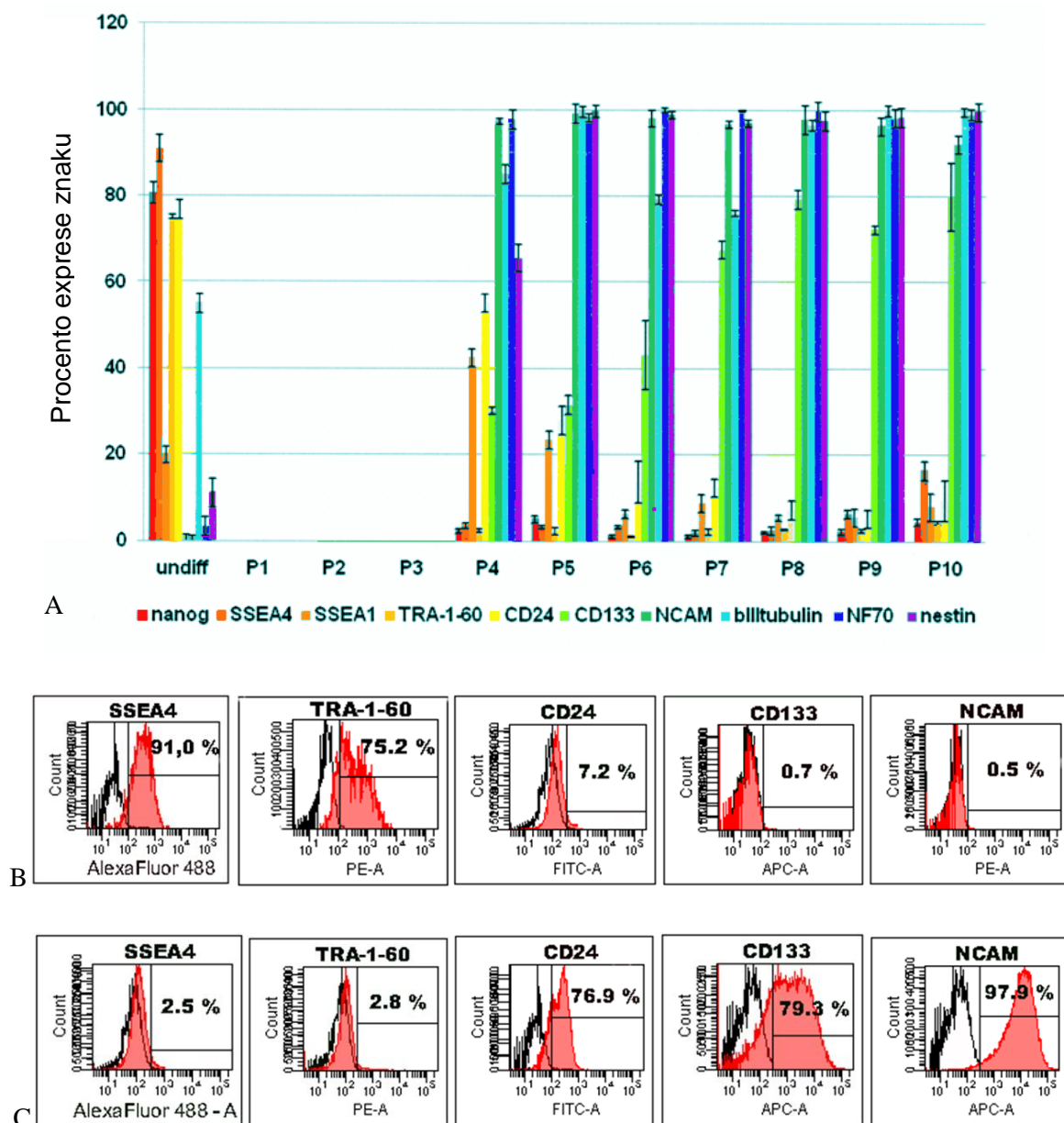
Suspenze nediferencovaných hESC a hESC-NPs byla značena pomocí protilátek na nanog, SSEA-4, SSEA-1, TRA-1-60, CD24, CD133, CD56 (NCAM), beta-III-tubulin, NF70, nestin, CD271 (NGFR), CD29 a HLA-ABC (Pruszk et al. 2007). Úroveň exprese byla kategorizována takto: 0 – 5 % negativní exprese, 6 – 39 % nízká exprese, 40 – 79 % střední exprese, 80 – 100 % vysoká exprese. Cytometrická analýza nediferencovaných hESC odhalila vysokou expresi nanog a SSEA-4, střední expresi CD24, TRA-1-60 a beta-III-tubulinu a nízkou expresi HLA-ABC, SSEA-1 a nestinu. Nediferencované buňky byly negativní na neuroektodermální marker NCAM, NF70, CD271, intermediární marker CD133 a integrin CD29. Souhrnně, nediferencované hESC jsou pozitivní na pluripotentní markery a negativní na vývojové neurální markery (obr. 11 B).

V případě diferencovaných hESC-NPs cytometrická analýza odhalila negativitu TRA-1-60 a nanogu a vysokou expresi neuroektodermálních markerů NCAM, beta-III-tubulinu, NF70, nestinu a CD29 (obr. 11 C). NPs byly negativní na SSEA-4 od pasáže 4, avšak přechodné zvýšení se objevilo v P 9 – 10. Expres CD24 a SSEA-1 klesla ze střední u nediferencovaných hESC k nízké v pasáži 4 a 5 zůstala nízká až negativní. Byla nalezena vysoká exprese CD271 (NGFR) v pasážích 4 až 8, v dalších



Obr. 10: Imunocytochemická charakterizace neuronů diferencovaných z hESC-NPs ve fázi II. Buňky pozitivní na beta-III-tubulin (A), NF70 (B) po dvou týdnech diferenciace a na beta-III-tubulin (C), NF160 (E) a synaptofyzin (G) po třech týdnech. Obr. D, F, H ukazuje větší zvětšení (výřez). Obr. (I) a (J) zobrazuje buňky pozitivní na glutamát a GABA po čtyřech týdnech kultivace.

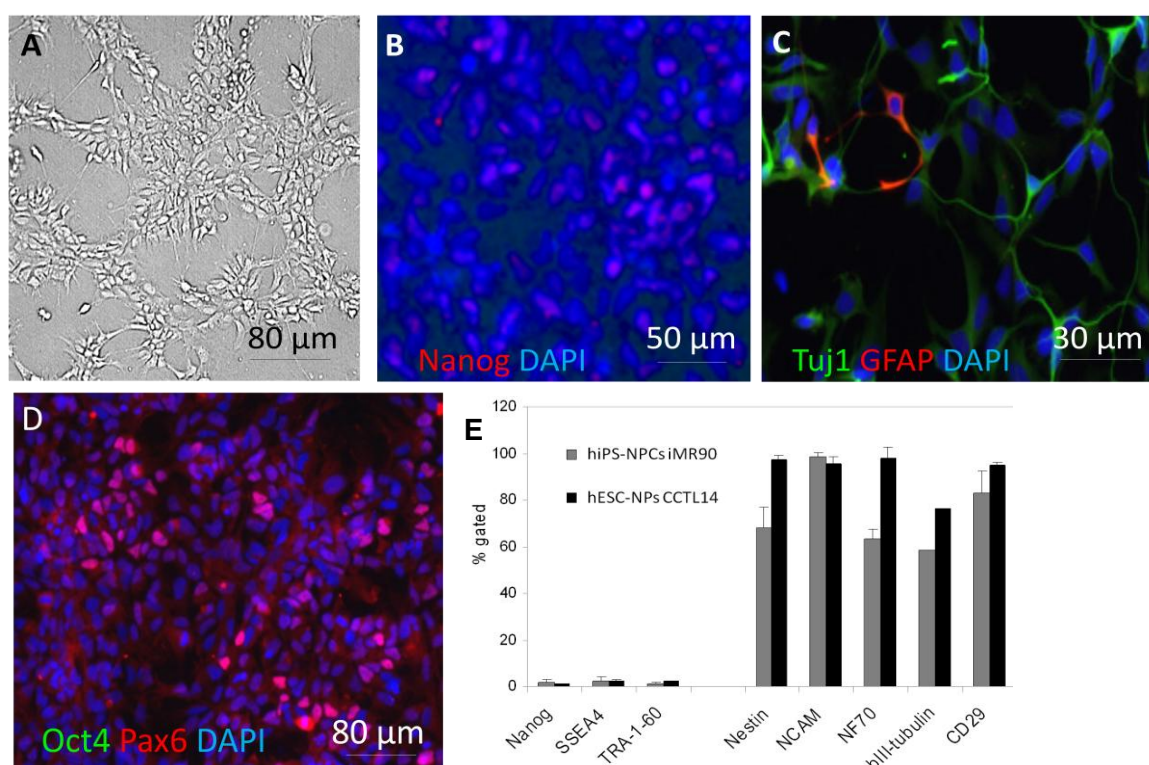
pasážích došlo k poklesu, což korelovalo se sníženou proliferací pozorovanou *in vitro*. Expres HLA-ABC se postupně v jednotlivých pasážích zvyšovala. Nejzajímavější vývoj jeví znak CD133, který se zvyšoval ze střední úrovně exprese v pasáži 4 k vysoké v pasáži 10, poté opět poklesl (obr. 11 A). Tyto výsledky lze souhrnně charakterizovat jako derivaci hESC směrem k neuroektodermálnímu fenotypu, kdy během dlouhodobé kultivace dochází ke snížení pluripotentních a intermediárních markerů a poklesu proliferační kapacity.



Obr. 11: Expres vybraných markerů u nediferencovaných hESC a hESC-NPs během dlouhodobé propagace *in vitro* (A). Histogramy zobrazují nejvýraznější rozdíly v expresi povrchových markerů u nediferencovaných hESC (B) a během neurální diferenciace hESC-NPs v pasáži 8 (C). Prázdné křivky představují izotypové kontroly, červeně značené buňky.

hiPS-ENPs a hiPS-NPCs

Časné neurální prekursory (hiPS-ENPs) *in vitro* vytvářejí typické rozetovité kolonie (obr. 12 A). Buňky tvořící kolonie exprimovaly nanog, pax6 a beta-III-tubulin, byly negativní na oct3/4. hiPS-NPCs byly již nanog-negativní, exprimovaly uniformně sox2 a dále se mezi nimi vyskytovaly buňky pozitivní na beta-III-tubulin a jednotlivé GFAP-pozitivní astrocyty (obr. 12 C). Cytometrická analýza hiPS-NPCs prokázala negativitu pluripotentních markerů a vysokou expresi neuroektodermálních markerů v profilu srovnatelném s hESC-NPs CCTL14 pasáže P8 (obr. 12 E). Fenotyp hiPS-NPCs analyzovaný v nejméně třech po sobě jdoucích pasážích byl stabilní a nevykazoval signifikantní změny.



Obr. 12: Diferenciace hiPSC iMR90 do hiPS-ENPs a hiPS-NPCs. hiPS-ENPs rostoucí v typických rozetách (A) exprimují nanog v jednotlivých buňkách (B), pax6 a není pozorovatelná exprese oct4 (D). Po sedmi dnech diferenciace kultura hiPS-NPCs obsahuje beta-III-tubulin-pozitivní neuronální buňky a GFAP-pozitivní astrocyty (C). FACS analýza ukazuje podobný fenotyp obou derivovaných linií, kdy nacházíme nízkou expresi pluripotentních markerů (nanog, SSEA-4, TRA-1-60) a vysokou expresi neuronálních diferenciálních markerů (nestin, NCAM, NF70, beta-III-tubulin, beta 1 integrin CD29) jak u NPCs z hiPS, tak z hESC (CCTL14).

5.1.3.2. Model léze a transplantace NPs

Devadesátiminutová okluze MCA způsobila ischemické poškození laterální části striata u 65 % zvířat (obr. 13, 14). U všech zvířat s transplantovanými nediferencovanými hESC a hESC-NPs P1 došlo k

vývoji tumoru *in vivo*. hESC-NPs P5 byly schopné přežití po sledovanou dobu (4 – 6 týdnů) a u 2 z 10 transplantovaných zvířat byla pozorována migrace buněk z místa transplantace do okolní tkáně, avšak u poloviny transplantovaných zvířat se tumor vyvinul také. Zvířata transplantovaná hESC-NPs P8 byla vyhodnocena po 8 – 12 týdnech přežití. Během této periody nebyl pozorován vývoj tumoru, u pěti zvířat z osmi byly nalezeny migrující buňky. U jednoho zvířete nebyly nalezeny žádné buňky lidského původu. Přežívající buňky byly identifikovány na základě positivity HuNu nebo MTCO2, tyto buňky byly zároveň pozitivní na NCAM, NSE a nestin (obr. 13). Graft u některých zvířat byl vyhodnocen jako obsahující buňky v počtu 400 – 600 x 10³ což naznačuje, že buňky si po transplantaci zachovaly schopnost proliferace.

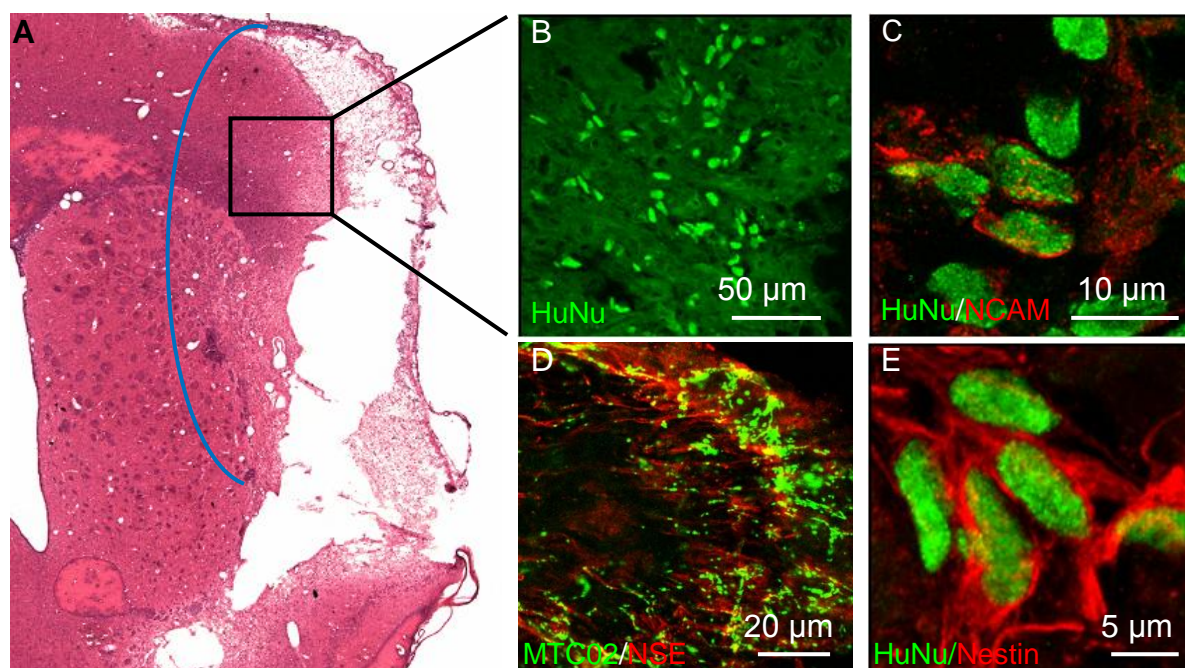
Poslední skupinou transplantovaných zvířat byla skupina s hESC-NPs P10. Zvířata přežívala 4, 8 a 12 týdnů. Přežití štěpu bylo v této skupině nejhorší (pouze 5 z 8 zvířat) a nekorelovalo s dobou přežívání zvířete. I v případě nálezu buněk v hostitelské tkáni byl jejich počet nízký a jejich migrace slabá. Nebyly přítomny žádné známky tumorigeneze (tab. 6).

Pro zhodnocení proliferační kapacity hESC-NPs P8 a P10 *in vitro* a *in vivo* byl spočten Ki67 index. Ki67 index u *in vitro* P8 a P10 byl 32,9±0,23 % a 16,2±0,24 %. Osm týdnů po transplantaci se počet Ki67-pozitivních buněk snížil na 25,1±0,26 % a 8,2±0,05 %. Po dvanácti týdnech po implantaci byl počet přežívajících hESC-NPs v pasáži 10 příliš nízký pro výpočet, v P8 klesl na 12,2±0,04 %. Tyto nálezy dokazují, že počet dělicích se buněk s posttransplační dobou klesá.

	hESCs	P1	P5	P8	P10
Počet zvířat	12	10	11	8	8
Přežití štěpu	12	10	10	7	5
Tumory	12	10	5	-	-
Migrace buněk v místě léze	-	-	2	5	2

Tab. 6 : Analýza několika sérií transplantací hESC a hESC-NPs během jejich dlouhodobé kultivace *in vivo*.

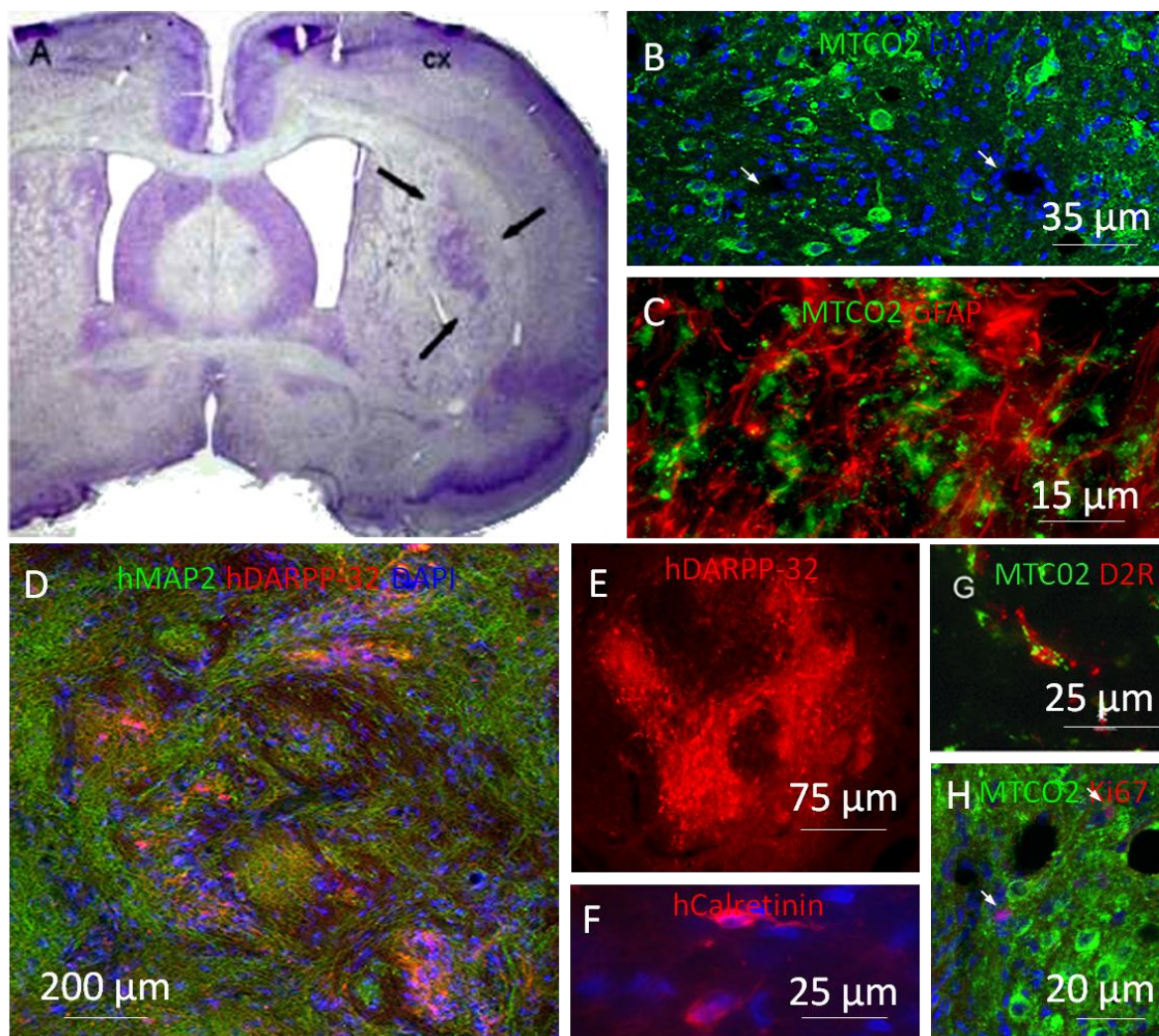
Graft hiPS-NPCs iMR90 byl identifikovatelný pomocí MRI a histologicky za měsíc po transplantaci. Buňky byly nalezeny v místě implantace s jednotlivými buňkami migrujícími do okolí transplantátu. Většina buněk byla nestin-pozitivní, byly identifikovány buňky pozitivní na sox2 a menší shluky pax6-pozitivních buněk, ale žádné pozitivní na oct3/4. Interakce mezi hostitelskou tkání a štěpem byly potvrzeny nálezem svazků výběžků pozitivních na lidský MAP2 pronikajících hostitelskou tkání. V obsahu graftu byly identifikovány morfologicky nezralé neurony pozitivní na DARPP-32 naznačující, že některé buňky zahájily terminální diferenciaci.



Obr. 13: Imunohistochemická identifikace neurálních prekursorů derivovaných z hESC pasáže P8 po experimentálním ischemickém iktu. Řezy z potkaního mozku 8 týdnů po transplantaci hESC-NPs P8. Modrá linie vykresluje oblasti migrace NPs (A). Imunohistochemická identifikace lidských buněk pomocí barvení HuNu (B), HuNu/NCAM (C), HuNu/NSE (D) a HuNu/nestin (E) prokazuje pozitivitu transplantovaných buněk na neuroektodermální markery.

Po čtyřech měsících implantované buňky pokračovaly v migraci do hostitelské tkáně a vyplnily postischemickou pseudocystu, postranní komora však zůstala rozšířená (obr. 14 A). Tkáň v místě léze obsahovala buňky původu zvířecího i lidského, krevní cévy (obr. 20 B) a astrocyty potkaního původu (obr. 14 C) byly promíšené s buňkami pozitivními na MTCO2. Ve striatu byly lokalizovány plně diferencované GABAergní neurony pozitivní na humánní DARPP-32. Kromě těchto DARPP-32 pozitivních neuronů, kde se molekula DARPP-32 pojí s dopaminovým receptorem typu 1, byly v transplantátu identifikovány i neurony s receptorem typu D2 (D2R) (obr. 14 G). Striatum dále obsahovalo roztroušeně interneurony pozitivní na kalretinin (obr. 14 F).

Podobně jako u transplantace hESC-NPs, byla věnována pozornost proliferační aktivitě transplantátu. Kvantifikace dle Ki67 indexu identifikovala v místě transplantátu $2,34 \pm 0,3$ % dělících se buněk. Tyto dělící se buňky však byly negativní na lidské markery, což tyto proliferující buňky charakterizuje jako hostitelského – zvířecího původu. Během 4 měsíců sledování osudu transplantátu pocházejícího z hiPS-NPCs iMR90 nebyla pozorována hyperproliferace ani tvorba tumoru a v místě graftu nebyly nalezeny dárcovské buňky jiného než neurálního fenotypu.

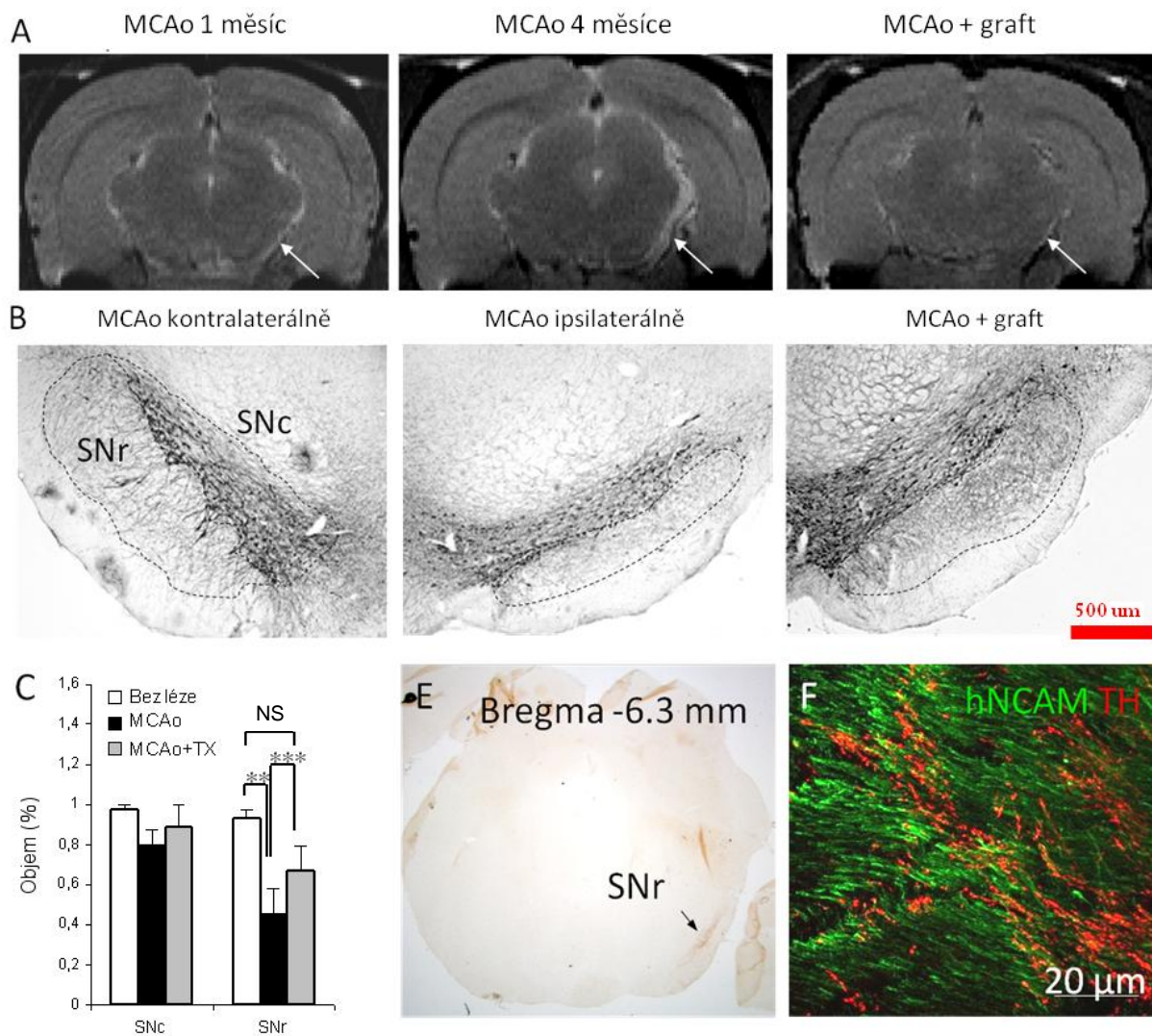


Obr. 14: hiPS-NPCs čtyři měsíce po transplantaci. Barvení kresylovou violetí vizualizuje graft v laterálním striatu (černé šipky) (A). Buňky transplantátu migrují hostitelskou tkáň, MTCO2-pozitivní buňky jsou mezi MTCO2-negativními hostitelské tkáň, které prezentují endotelie (bílé šipky) (B) a astrocyty (C). Graft obsahuje shluky DARPP-32 pozitivních neuronů (D, E), kalretinin-pozitivní interneurony (F) a neurony s dopaminovými receptory typu 2 (G). Dělicí se buňky pozitivní na Ki67 jsou zvířecího původu (H).

Ke sledování projekce implantovaných hiPS-NPCs bylo použito specifické barvení na lidský NCAM. Měsíc po transplantaci byly svazky hNCAM-pozitivních myelinizovaných vláken pozorovatelné v hostitelském striatu a pallidu v maximální vzdálenosti 2 mm kaudálně od místa implantace. V substantia nigra nebyla nalezena žádná vlákna lidského původu. Po dvou měsících od implantace se lidské axony prodloužily přes entopedunkulární jádro do nejkaudálnější části substantia nigra, kde byly denzní svazky lidských axonů nalezeny v substantia nigra – pars reticulata v těsné blízkosti s TH-pozitivními vlákny hostitelskými (obr. 15 E, F). Ojedinelá hNCAM-pozitivní vlákna byla nalezena v thalamu a c. callosum.

T2 vážené MRI scany odhalily atrofii v zadním mozku na úrovni substantia nigra, která byla potvrzena barvením na TH (obr. 15 A, B). Po měsíci od léze měla zvířata s MCAo zmenšený objem

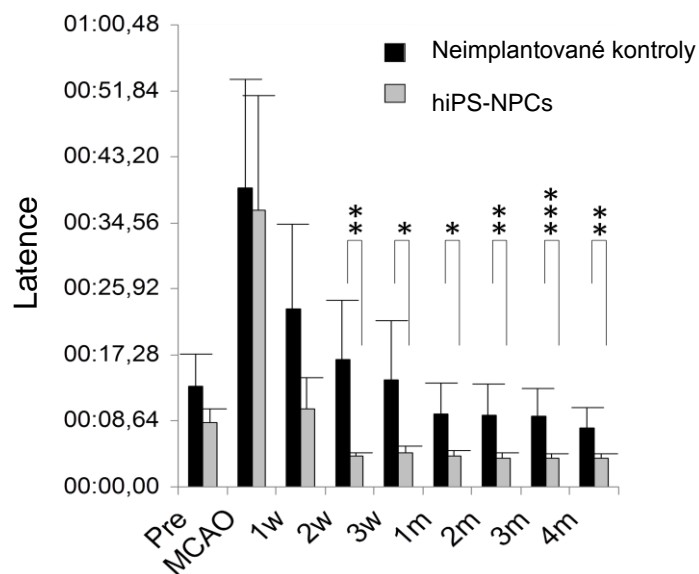
substantia nigra – pars reticulata ipsilaterálně – o $61,1 \pm 16,8$ % proti intaktním zvířatům. Transplantace hiPS-NPCs iMR90 snížila atrofii SN – pars reticulata o $27,13 \pm 11,50$ % (obr. 15 C). Snížení objemu substantia nigra – pars compacta po MCAo nebyla signifikantní, přesto však zde došlo k významnému snížení počtu dopaminergních neuronů (redukce o $46,20 \pm 12,41$ % u netransplantovaných zvířat po MCAo proti $21,11 \pm 6,65$ % u zvířat transplantovaných).



Obr. 15: Transplantace hiPS-NPCs zabraňuje atrofii substantia nigra. T2 vážené MRI scany potkaního mozku zobrazují pravostrannou atrofii (šipky), která je u transplantovaného zvířete (MCAo + G) méně výrazná (A). Barvení na nespecifickou tyrosinhydroxylázu (TH) v oblasti substantia nigra – pars compacta (SNc) a substantia nigra – pars reticulata (SNr) za 1 měsíc po MCAo. Oblasti ohraničené přerušovanou čarou vyznačují oblasti vybrané pro volumometrii (B). Transplantace hiPS-NPCs signifikantně redukuje atrofii v SNr způsobenou ischemií (C). Lidské axony projikují do SN (E) a mísí se v tkáni s hostitelskými axony pozitivními na TH projikujícími ze SNc na vstupu do SN (F). NS – nesignifikantní, * $p < 0,05$.

5.1.3.3. Behaviorální testování

Výsledky testování senzomotorické dysfunkce pomocí testu s lepící páskou odhalily signifikantní návrat funkce u zvířat s transplantovanými hiPS-NPCs iMR90. Test prokázal významné zlepšení u transplantovaných zvířat od druhého týdne po graftu. Signifikantní rozdíl byl patrný po celé čtyři měsíce během přežívání zvířat (obr. 16).



Obr. 16: Transplantace hiPS-NPCs významně napomáhá návratu funkce. Výsledky testu s lepící páskou ukazují signifikantní zlepšení od druhého týdne po transplantaci.

5.1.4. Závěr

Studovali jsme vlastnosti neurálních a neuronálních prekursorů derivovaných z různých typů pluripotentních kmenových buněk kultivovaných za různých podmínek, jejich osud po transplantaci do pokusného zvířete s experimentálně vyvolanou ischemickou lézí a přínos pro zlepšení funkce experimentálního zvířete. Zjistili jsme, že neurální prekursor z obou buněčných zdrojů po indukci diferenciace *in vitro* exprimují neuroektodermové markery v podobném profilu. Neurální prekursor indukované z lidských embryonálních buněk tvoří v časných pasážích (P1) po implantaci *in vivo* tumory, přičemž tumorigenicita s prodlouženou kultivací v indukčním médiu klesá na polovinu (P5) až k úplnému potlačení tvorby nádorů (P8), další kultivace je spojena s nízkým přežitím graftu (P10). Tyto nálezy jsou spojeny s postupným poklesem exprese intermediárních markerů (SSEA-1) (P7 – P8) a poklesem exprese receptoru pro neurální růstový faktor (pokles přežití graftu u P10). Tvorba tumorů nebyla pozorována u diferencovaných neurálních prekursorů derivovaných z lidských pluripotentních buněk. Jejich fenotyp byl stabilní, grafty přežívaly čtyři měsíce a bylo pozorováno vyzrávání buněk *in vivo* do maturovaných funkčních neuronů. Implantované buňky projikovaly axony do správných cílových struktur mozku (substantia nigra, thalamus, corpus callosum). Implantované buňky poskytly významnou ochranu před atrofií funkčně souvisejících struktur nezasažených ischemií (substantia nigra). Zvířata s implantovanými buňkami dosáhla funkčního zlepšení oproti neimplantovaným kontrolám již po dvou týdnech po implantaci neurálních prekursorů a toto zlepšení přetrvávalo po celou dobu sledování pokusných zvířat.

5.2. Pěstování mesenchymálních kmenových buněk v různých médiích

Podkladem této části práce je publikace:

Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, Sykova E, Jendelova P.: Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy*. 2009;11(7):874-85. IF 3.471

5.2.1. Úvod

Mesenchymální stromální buňky jsou dlouhou dobu předmětem intenzivního zájmu. Na rozdíl od embryonálních buněk se s jejich využíváním nepojí tolik eticky sporných otázek, jsou poměrně jednoduše dostupné a snadno kultivovatelné. Velmi důležitá vlastnost mesenchymálních stromálních buněk je jejich schopnost produkce širokého spektra bioaktivních molekul, které pomáhají navodit regenerativní prostředí v poškozené tkáni (viz 3.3.2 Buněčná terapie, mechanismus účinku), která je v současnosti významnější pro využití v klinice než vzpomínaný druhý efekt kmenových buněk – nahrazení chybějících buněk. Pro klinickou praxi zde zůstává základní požadavek rychlé izolace a expanze těchto buněk, kdy terapeutické okno může být poměrně úzké, byť širší než pro konvenční léčbu (Boltze et al. 2012), kdy se v experimentu na modelu ischemického stroku ukázalo časné podání umbilikálních stromálních buněk do 72 hodin po inzultu jako nejefektivnější na záchranu a obnovení neurologických funkcí. U člověka je vzhledem k jinému časovému průběhu reparačních procesů terapeutické okno širší, přesto je vhodné načasování předmětem intenzivního výzkumu (Cramer et al. 2007; Wang et al. 2013). Široce používané kultivační médium založené na přidavku fetálního bovinního séra však nevyhovuje z několika důvodů – risk přenosu prionů asociovaný s použitím hovězího materiálu, dále kontaminace atypickými zvířecími pestiviry, které jsou obtížně detekovatelné (Xia et al. 2013; Liu et al. 2008), v neposlední řadě také riziko rozvoje imunitních reakcí na zbytkové proteiny hovězího séra (Selvaggi et al. 1997). Požadavek na xeno-free médium vychází z Evropské komise a Evropské lékové agentury – EU Guideline for GMP, Annex 1 (výroba sterilních LP) a Annex 2 (výroba LP biologického původu, EMEA/CHMP/96268/2005 a EMEA/CHMP/410869/2006 na vývoj lidských humánních přípravků moderní terapie). K překonání těchto problémů vychází jako základní doporučení využívat lidské sérum, přednostně autologní, kdy byl popsán vysoký výtěžek (Stute et al. 2004). Tento požadavek však není vždy možné dodržet, zejména v případech polytraumat a těžkých onemocnění nelze odebrat takové množství materiálu pro přípravu dostatečného množství kultivačního média. Jeho nahrazení allogéním množstvím smíšeného séra se však neukazuje jako vhodné, buňky nevykazují dostatečnou proliferaci (Shahdadfar et al. 2005). Možnost bezsérových médií s rekombinantními růstovými faktory je další možností, pro značnou finanční nákladnost však není uplatnitelná ve výrobě v případě požadavku na expanzi mesenchymálních buněk v počtu milionů.

Kritéria pro definování MSC byla stanovena Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) s odkazy na klíčové publikace (Conget a Minguell 1999; Pittenger et al. 1999; Dominici et al. 2006). Minimálními kritérii, která musí být splněna, jsou 1) větvenovité buňky, adherující k plastiku, před první pasáží tvořící kolonie (CFU), 2) schopnost diferenciace do osteo-, chondro- a adipocytů a 3) *in vitro* kultivované buňky exprimují CD73, CD90, CD105 a HLA-ABC, avšak ne hematopoetické znaky CD34 a CD45. K dalším pozitivním markerům patří CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD71, CD106, CD120 či CD166 a k negativním CD10, CD11, CD14, CD19, CD271 či glykoforin A. Buňky splňující tyto požadavky mohou být označeny za mesenchymální stromální buňky. Ve snaze nalézt nová média pro kultivaci a expanzi buněk pro translační medicínu jsme se zaměřili na charakteristiku těchto vlastností, včetně hodnocení dalších růstových modalit, konkrétně CFU, PD a buněčný cyklus.

5.2.2. Metodika

5.2.2.1. Buněčné kultury

Lidské MSC byly získány z aspirátu kostní dřeně od zdravých donorů ve věku 19 – 41 let. Mononukleární frakce byla izolována pomocí gradientové centrifugace na Ficollu. Získaná suspenze byla spočítána a vyseta na 10 cm Petriho misky v denzitě dle požadavků jednotlivých typů experimentu. MSC byly izolovány na základě jejich adherence k plastiku a neadherentní buňky byly odmyty 72 h po vysetí. Jako kultivační médium byl připraven alfa-Minimum Essential Medium (α -MEM) obsahující 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu a následující séra: 2,5 %, 5 %, 10 % a 20 % FBS, 5 % a 10 % allogení sérum od dospělých donorů s krevní skupinou AB (hABS), 5 % a 10 % sérum z pupečnickové krve (hCBS) a komplexní kultivační medium pro mesenchymální bunky (MSCGMTM) výrobce Lonza/Cambrex. Gradientovou centrifugací získaná mononukleární frakce byla rozdělena a vysévána vždy přímo do všech testovaných médií, vzorky z jednoho média nebyly nikdy vystaveny působení odlišného séra. Všechny pokusy byly provedeny minimálně třikrát. Médium bylo vyměňováno dvakrát týdně a buňky pasážovány pomocí trypsinu/EDTA dle potřeby (při dosažení růstové konfluence).

5.2.2.2. Formování kolonií (CFU) a doba zdvojení populace (PD)

Buněčná suspenze po centrifugaci byla vyseta v denzitě 1×10^6 mononukleárů na 10 cm Petriho misku, tedy 1 300 buněk na cm^2 . Po dvou týdnech kultivace bez pasáží byly narostlé kolonie obarveny 0,5 % krystalovou violetí. Kolonie větší než 2 mm v průměru byly sečteny a byla vypočtena celková plocha kolonií.

Pro vyhodnocení PD byly kultury po dosažení velkých kolonií sklizeny, buňky vysety na 3,5 cm Petriho misky v denzitě 150 buněk na cm^2 a na dně každé misky bylo vyznačeno pět kroužků o ploše 20 mm^2 . Počet buněk v těchto kružnicích byl počítán každý den během následujících 4 dní. Přírůstky byly spočteny jako počet buněk nalezený jeden den dělený počtem buněk z předchozího dne a výsledek označen jako F. PD mezi dvěma libovolnými dny byl pak vypočten jako $\text{PD} = 2/F \times \text{čas v hodinách}$, který uplynul mezi dvěma počítáními buněk. Průměrný čas zdvojení během čtyřdenního experimentu byl počítán jako $\text{PD}_{1-2} + \text{PD}_{2-3} + \text{PD}_{3-4}/3 = \text{PD}$.

5.2.2.3. Buněčný cyklus

Buňky byly po dosažení velkých kolonií vysety v denzitě 5 000 MSC/ cm^2 , kultivovány týden a po sklizení fixovány 70 % ethanolem. DNA byla obarvena roztokem BD PI/RNase a její obsah hodnocen na průtokovém cytometru BD FACS AriaTM.

5.2.2.4. Exprese povrchových markerů

Buňky byly stejně jako pro buněčný cyklus vysety na 150 cm² kultivační láhve a pěstovány k dosažení dostatečného množství buněk (3 – 4 pasáž), minimálně 2,5 x 10⁵ na hodnocení jednoho markeru. Po sklizení pomocí trypsinu/EDTA byly rozsuspendovány, inkubovány v označených zkumavkách s příslušnými protilátkami a exprese povrchových markerů byla vyhodnocena na průtokovém cytometru BD FACS AriaTM. Byla použita následující řada protilátek: CD10 FITC, CD 29PE, CD34 FITC, CD44 FITC, CD45 PE-Cy5, CD49a PE, CD61/51 PE, CD71 PE, CD73 PE, CD90 FITC, CD105 Dyomics647, CD235a PE, CD271 PE, HLA-A,B,C FITC, HLA-DR, DP FITC, purified antifibroblast surface marker + sekundární protilátka FITC. Dále byly použity izotypové kontroly IgG1 FITC, IgG1 PE, IgG1 PE-Cy5, IgG2a PE a IgG2b FITC.

5.2.2.5. Diferenciace MSC

Pro chondrogenní diferenciaci byly buňky sklizeny, upraveny centrifugací do pelety (250 000 buněk v peletě) a opatrně přemístěny do chondrogenního bezsérového média obsahujícího α -MEM, dexamethason, hTGF-beta1, L-askorbát, BDTM ITS+ universální supplement premix 1 % a penicilin/streptomycin. Po třech týdnech byly pelety vyjmuty, fixovány 4 % paraformaldehydem (PF), po zalití do parafinových bloků krájeny a řezy nabarveny alciánovou modří.

K indukci adipogenní diferenciace byly buňky vysety v denzitě 10 000 na cm² a pěstovány do dosažení konfluence. Médium pro adipogenní diferenciaci obsahovalo α -MEM, 10 % FBS, 10 % hABS nebo 10 % hCBS a dále dexamethason, 3-isobutyl-1-methylxanthin, indometacin, insulin a penicilin/streptomycin. Médium bylo měněno dvakrát týdně a po 10 dnech byly buňky fixovány 4 % PF a barveny pomocí olejové červeně.

Pro ostegenní diferenciaci byly buňky vysety na šestijamkovou destičku v denzitě 3 000 buněk na cm². Po jednodenní adherenci byly kulivovány v médiu obsahujícím α -MEM a 10 % FBS, 10 % hABS nebo 10 % hCBS, dále dexamethason, β -glycerofosfát, L-askorbát a penicilin/streptomycin. Médium bylo měněno dvakrát týdně. Po 7 – 20 dnech byly buňky fixovány 4 % PF a barveny červeným alizarinem.

5.2.2.6. Statistická analýza

Počty kolonií, PD time, buněčný cyklus a exprese markerů byly hodnoceny pomocí jednocestné ANOVA a Studentovým nepárovým t-testem, signifikantní výsledky byly vyjádřeny jako $p < 0,05$. Použit byl program Statistica a Gnumeric.

5.2.3. Výsledky

5.2.3.1. Formování kolonií (CFU) a doba zdvojení populace (PD) a buněčný cyklus

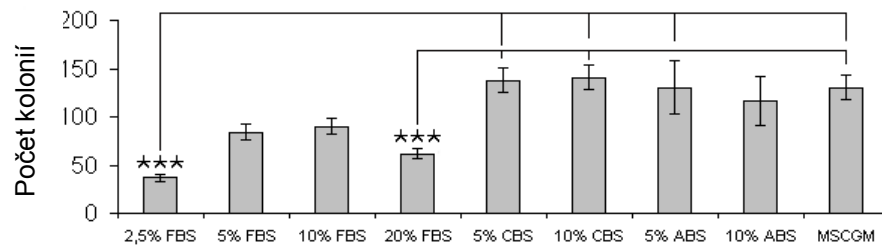
CFU byla vyhodnocena spočítáním kolonií větších než 2 mm, změřením jejich průměrů a výpočtem plochy pokryté hodnocenými koloniemi. Všeobecně, schopnost buněk formovat kolonie a celková plocha byla významně lepší v lidských sérech ve srovnání s hovězími. V rámci jednotlivých zkoumaných parametrů byl počet kolonií signifikantně menší v 5 % a 20 % α -MEM /FBS oproti ostatním (obr. 17 A), průměr těchto kolonií byl však mnohem vyšší v α -MEM/hABS a MSCGM, následovaný α -MEM/hCBS (obr. 17 B). Tyto nálezy značí schopnost buněk adherovat ve všech médiích, avšak schopnost růstu je potencována výrazně v lidských sérech a MSCGM. Celková plocha kolonií byla nejvyšší v α -MEM/lidské séra a MSCGM, zatímco α -MEM/FBS byla významně nižší a v rámci médií s hovězím sérem bylo nejlepšího výsledku dosaženo v případě α -MEM/10 % FBS (obr. 17 C).

Čas zdvojení populace se pohyboval mezi 44 hodinami (α -MEM/FBS) a 21 hodinami (α -MEM/10 % hABS). Byla pozorována variabilita v PD mezi jednotlivými donory, neprokázala se však statisticky významná korelace mezi věkem a PD. Jednocestná ANOVA prokázala vysoký rozdíl mezi médii s lidskými a hovězími séry (obr. 18).

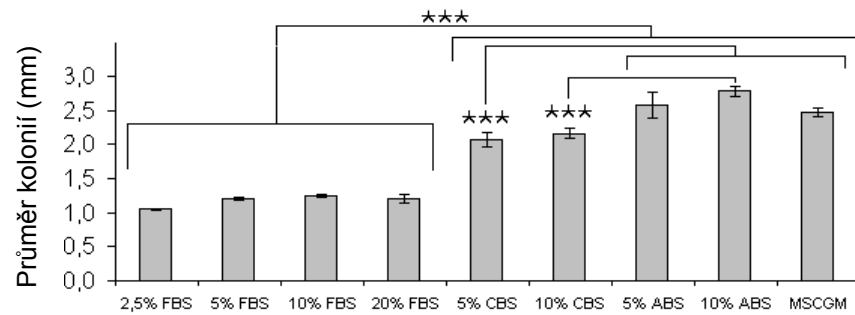
Buněčný cyklus byl vyhodnocen na základě barvení DNA a změn jejího množství během buněčného cyklu. Souhrnně, pouze malá část buněk proliferovala (fáze S + G2 + M), většina buněk (kolem 90 %) setrvala ve fázi G1/G0. Byla pozorována velká variabilita v procentu buněk v jednotlivých fázích cyklu bez ohledu na typ média či věk donorů a průměrné hodnoty nevykázaly žádný signifikantní rozdíl mezi médii.

5.2.3.2. Exprese povrchových markerů

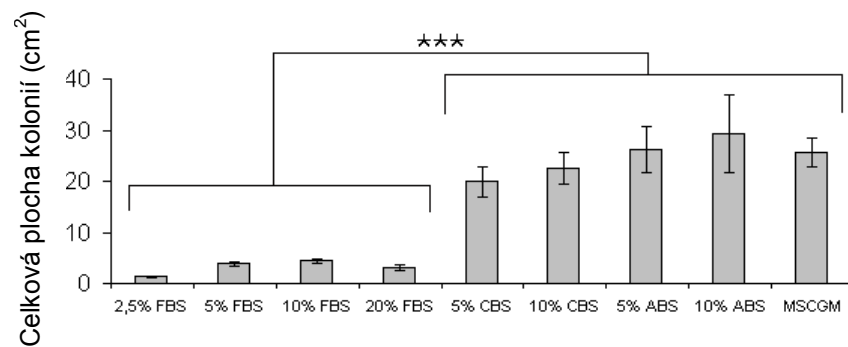
Exprese CD10, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49a, CD61/51, CD71, CD73, CD90, CD105, CD235a, CD271, HLA-A,B,C, HLA-DR+DP a antifibroblast surface marker byly hodnoceny na buňkách v těchto médiích: 5 % a 10 % FBS, 5 % a 10 % hABS, 5 % a 10 % hCBS/ α -MEM a MSCGM. V 2,5 % a 20 % FBS kultury nedorostly do množství dostatečného pro cytometrickou analýzu. V shodě s minimálními kritérii ISCT byly buňky ve všech médiích negativní na CD34, CD45, CD235a a CD271 a pozitivní na CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 a HLA-A,B,C. Tab. 7 ukazuje relativní pozitivitu markerů buněk pěstovaných v různých médiích. Obecně, exprese pozitivních markerů byla zvýšená u kultur z α -MEM/lidská séra a MSCGM a potlačena u α -MEM/FBS, kde dále klesala se snižujícím se množstvím séra. Mezi jednotlivými médii byla pozorována rozdílná exprese adhezních markerů (CD44), metabolických (CD71) a integrinů (CD 29, CD51/61, CD49a) v závislosti na typu a množství přidaného séra (tab. 7).



A

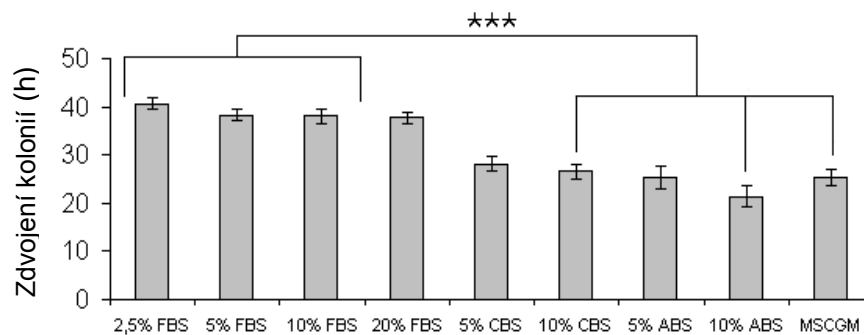


B



C

Obr. 17: Počet kolonií (A), průměr kolonií (B) a celková plocha kolonií (C) buněk rostoucích v různých médiích. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr a směrodatná chyba (SE). *** $p < 0,01$.



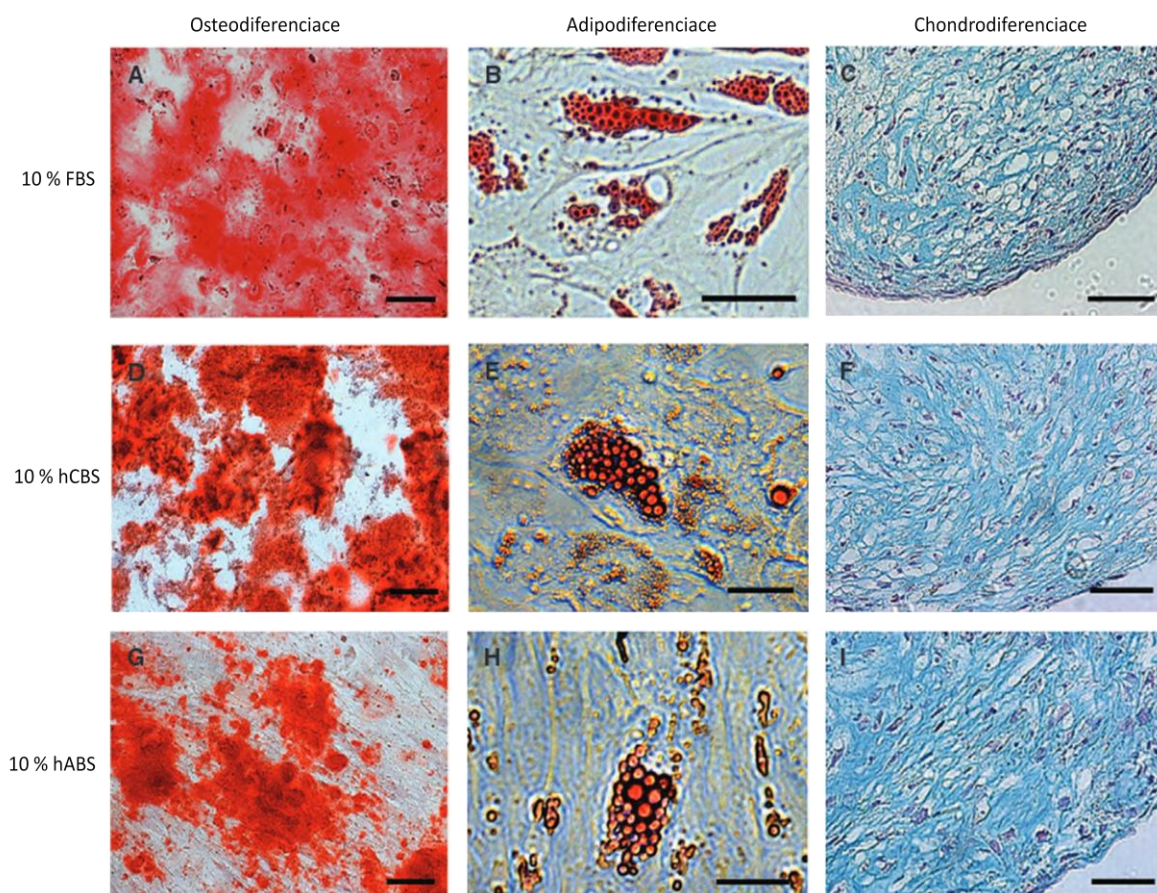
Obr. 18: Zdvojení populace lidských MSC v různých médiích. Doba zdvojení populace byla signifikantně kratší v α -MEM/lidská séra a MSCGM. Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr a směrodatná chyba (SE). *** $p < 0,01$.

	5 % FBS	10 % FBS	5 % ABS	10 % ABS	5 % CBS	10 % CBS	MSCGM
CD10 CALLA	-	-	+	+	+	+	+
CD29 Integrin, beta 1	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD34 Marker hematopetických progenitorů	-	-	-	-	-	-	-
CD44 Adheze k hyaluronanu	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD45 Leukocytární společný antigen	-	-	-	-	-	-	-
CD49a Integrin, alpha 1	-	-	+	++	+	+	+
CD61/51 Integrin $\alpha v/\beta 3$	-	-	++	++	+	+	+
CD71 Transferinový receptor	-	-	+++	++	++	++	++
CD73 5'-ekto-nukleotidáza (NT5E)	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD90 Thy-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD105 Endoglin, část receptorového komplexu TGF- β	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD235a Glykoforin A	-	-	-	-	-	-	-
CD271 NGFR	-	-	-	-	-	-	-
HLA-I	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HLA-II	-	-	-	-	-	-	+
Fibroblastový specifický antigen	-	-	-	+	-	-	+

Tab. 7: Expres povrchových markerů stanovená pomocí průtokové cytometrie. –, negativní (< 10 %), +, slabá exprese (11 – 40 %), ++, střední exprese (41 – 70 %), +++ silná exprese (> 71 %). Klasifikační kritéria dle (Soukup 2007).

5.2.3.3. Buněčná diferenciace

K průkazu zachované diferenciační kapacity kultur pěstovaných v různých médiích byla provedena diferenciace buněk expandovaných v 10 % α -MEM/hABS, 10 % α -MEM/hCBS a 10 % α -MEM/FBS, kdy byla tato séra užita přímo v derivačním médiu pro adipogenní a osteogenní diferenciaci. Pro chondrogenní diferenciaci byly užity pouze v těchto médiích pěstované buňky, diferenciace probíhá v bezsérovém médiu a toto je nahrazeno suplementem BDTM ITS+. Žádné z testovaných médií nemělo negativní vliv na diferenciační kapacitu. Osteogenní potenciál byl zesílen v přidavku 10 % hCBS, kde se výrazná vápníková depozita začala objevovat již 7. den po indukci diferenciace. Podobné výsledky byly dosaženy u buněk pěstovaných v 10 % α -MEM/hABS, kde diferenciace do osteoblastů trvala jen 11 dní, ve srovnání s 20 dny potřebnými pro osteogenní diferenciaci v 10 % α -MEM/FBS (obr. 19).



Obr. 19: Diferenciační kapacita hMSC. Diferenciace do osteoblastů (A, D, G) byla potvrzena tvorbou kalciových depozit barvených alizarinovou červení. Buňky byly diferencovány za přítomnosti 10 % FBS (A), 10 % hCBS (D) a 10 % hABS (G). Diferenciace do adipocytů (B, E, H) byla potvrzena formováním lipidových kapének barvitelných olejovou červení. Buňky byly diferencovány za přítomnosti 10 % FBS (B), 10 % hCBS (E) a 10 % hABS (H). Diferenciace do chondrocytů (C, F, I) probíhala v peletách a byla potvrzena vznikem depozit kyselých mukopolysacharidů barvitelných alcianovou modří. Buňky byly před přenesením do diferenciačního média expandovány v 10 % α -MEM/FBS (C), 10 % α -MEM/hCBS (F) and 10 % α -MEM/hABS (I). Měřítka A, D, G = 20 μ m, B, E, H = 10 μ m, C, F, I = 50 μ m.

5.2.4. Závěr

Studovali jsme růstové vlastnosti, expresi povrchových markerů a schopnost diferenciaci lidských mesenchymálních buněk kultivovaných v různých médiích. Cílem studie bylo zhodnotit vliv sér různých zdrojů na vlastnosti MSC s výhledem na budoucí využití v klinice. Studie kinetiky buněčného růstu odhalila, že čas nutný pro zdvojení populace buněk kultivovaných v 10 % α -MEM/FBS byl téměř dvojnásobný než pro buňky kultivované v α -MEM/hABS. Analýza buněčného cyklu neprokázala žádné rozdíly v proporcích buněk v jednotlivých fázích cyklu kultivovaných v různých médiích. V žádném ze všech použitých médií nebyla dotčena exprese určujících povrchových markerů MSC, jak pozitivních (CD73, CD90 a CD105), tak negativních (CD34, CD45). Schopnost diferenciaci do adipocytů, chondrocytů a osteoblastů nebyla narušena v žádném séru, naopak rychlost ukládání kalciových depozit byla zvýšena v α -MEM/hABS a α -MEM/hCBS.

5.3. Magnetické částice v biomedicínských aplikacích

Podkladem k této části práce jsou publikace:

Novotna B., Jendelova P., Kapcalova M., Rossner P., Turnovcova K., Bagryantseva Y., Babic M., Horak D., Sykova E.: Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2012 Jan 16;210(1):53-63, IF 3.605

Nataliya Chekina, Daniel Horak, Pavla Jendelova, Miroslava Trchova, Milan J. Benes, Martin Hruby, Vit Herynek, Karolina Turnovcova and Eva Sykova: Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 7630. IF 4.795

5.3.1. Úvod

Povaha obalu nanočástice a její rozměr podmiňuje nejen velikost, ale i stabilitu koloidu, biodistribuci a biokinetiku částice. Neobalené SPIO částice jsou hydrofobní a jsou rizikové z hlediska agregování a vypadávání ze suspenze. Obal částic zvyšuje jejich hydrofilitu a zlepšuje tak biologickou dostupnost a rychlost transportu přes membránu (Babic et al. 2008). Obal sám o sobě by měl být biokompatibilní a neimunogenní. K nejčastějším obalovým materiálům patří organické polymery (dextran, chitosan, polyethylenglykol), surfaktanty (dodecylamin), anorganické kovy (zlato, platina), oxidy (silika, uhlík) a bioaktivní molekuly (lipozómy, peptidy, receptory). Polymerové obaly ovšem zvyšují velikost částic, což na druhé straně může jejich biologickou dostupnost, průnik tkáněmi a biologickou clearanci ovlivnit negativně. Částice s velkým poměrem povrch/objem mají tendenci agregovat a v biologických soustavách interagovat s biologickými komponentami včetně rizika obalit se plasmatickými proteiny, což zvyšuje jejich atraktivitu pro makrofágy a snižuje jejich poločas v organismu (Gupta a Gupta 2005). Komerčně dostupné SPIO částice (Endorem®) většinou sestávají z magnetického jádra potaženého biodegradabilním dextranem nebo polysacharidovými deriváty. Při vazbě fluorescenční značky na částice vznikají problémy s chemickou stabilitou vazby fluoroforu na částici či její obal. V roztoku či použití *in vivo* dochází ke ztrátě fluorescenčního signálu při odbourávání biodegradabilního obalu (dextran-SPIONs). SPIO částice obalené silikou poskytují kromě biokompatibility dobrou stabilitu v roztoku i za změn pH a dostatek vazebných míst pro vazbu specifických ligandů. Silikou potažené maghemitové částice byly připraveny jednokrokovým procesem pyrolýzy v roztoku metanolu obsahujícím citrát železito-amonný a tetraetoxysilan (TEOS) (Tartaj et al. 2001). Metoda sol-gel využívající TEOS nebo funkční silany (3-aminopropyltriethoxysilan, APTES) je nejčastěji využívaná a umožňuje vytvářet silikový obal o kontrolované tloušťce, funkční silany nabízejí přídavná vazebná místa pro další ligandy.

V této práci představená studie analyzuje různé typy SPIO částic lišících se povrchovým obalem, testované na lidských mesenchymálních kmenových buňkách. V předchozích letech byly vyvinuty SPION obalené D-manózou (Horak et al. 2007), poly-L-lysinem (PLL) (Babic et al. 2008) a poly(N,N-dimethylakrylamidem) (Babic et al. 2009). Biologické účinky těchto částic byly srovnávány s nepotahovanými částicemi $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) a komerčně vyráběným Endoremem®. Endorem® jsme měli též k dispozici obalený PLL a Endorem® v suspenzi s PLL.

SPIONs založené na oxidech železa jsou prokazatelné barvením, jako je vznik modrého barviva (Turnbullovy nebo pruské modři) po reakci Fe iontů se žlutou nebo červenou krevní solí. Vzhledem k přirozenému obsahu železa jako biogenního prvku s ovšem potýkáme se značnou nespecifitou průkazu pomocí tohoto barvení, pro nanočástice jiného složení (kobalt, mangan) není specifické barvení dostupné. Druhým cílem bylo navrhnout, připravit a charakterizovat nové bimodální SPION, kombinující fluorescenční a magnetické vlastnosti najednou. Jako fluorescenční značka byl zvolen fluorescein isothiokyanát (FITC). FITC je široce používaný fluorofor s excitací a emisí kolem 495 nm/519 nm (zelená část spektra). Využívá se v rozsáhlém spektru aplikací včetně průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Jde o poměrně slabý fluorofor a je silně závislý na pH prostředí. Fluorescence prudce stoupá při pH 5 – 8, při fyziologickém pH (7,4) je jeho intenzita vysoká. Pro tuto fázi pokusu byly připraveny SPION obalené silikou (SiO_2) a (3-aminopropyl)triethoxysilanem (APTES) nebo karboxymetylchitosanem (CMCS). CMCS obsahuje silné chelatační skupiny, což umožňuje pevné spojení se SPIO nanočásticemi. Karboxymetylce chitosanu umožní rozpustnost ve vodě při neutrálním a alkalickém pH, čímž získáme přidání funkčních skupin pro vazbu fluorescenčních látek.

Toxicita nanomateriálů úzce souvisí se složením, velikostí, tvarem (Afrooz et al. 2013) a cestou podání. Ačkoliv některé druhy SPIO částic jsou chválené FDA (Feridex), přesto zde zůstává určitý stupeň toxicity spojený s degradací dextranového obalu a vystavení oxidu železa. Za mechanismus toxicity SPIONs na buněčné úrovni je považován akcelerovaný vývoj volných radikálů přímo na povrchu částic, případně aktivace oxidativních procesů v mitochondriích a vyčerpání antioxidantů v buňce. Dalším mechanismem vedoucím k poškození buňky je přímá mechanická interakce nanočástic s buněčnými komponentami během buněčného cyklu (Donaldson et al. 2010). Zhodnotit viabilitu, úspěšnost značení buněk po kultivaci s SPION s různými obaly a poškození DNA, peroxidaci proteinů a lipidů bylo cílem práce.

5.3.2. Metodika

5.3.2.1. Příprava nanočástic

Částice zavzaté do pokusu zahrnovaly komerční Endorem® (Fe_3O_4 , dextranový obal), dále částice založené na maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), s obalem z poly-L-lysinu ($\text{PLL-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), D-manózy (mannose- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a poly(N,N-dimethylakrylamidu) ($\text{PDMAAm-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Byl připraven Endorem® obalený PLL (PLL-Endorem®) a směs Endorem® s poly-L-lysinem v ředění 1 : 2 000 při 25 $\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ ($\text{Endorem®} + \text{PLL}$). Jako kontrola sloužil neobalený $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Pro testy bimodálních částic byly nejprve připraveny částice založené na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obalené karboxymetylchitosanem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$) a obalené tetraetoxysilanem (TEOS) ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$) jako výchozí pro další modifikace povrchu pomocí (3-aminopropyl)triethoxysilanu (APTES) a poté karboxymetylchitosanu. Výsledkem byly částice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$, na které se navázal FITC. Jako kontrola byl použit přípravek Endorem®.

Podrobný popis chemické přípravy částic viz publikace (Horak et al. 2007), (Babic et al. 2008), (Babic et al. 2009).

5.3.2.2. Buněčné kultury

Pro testy intracelulárního značení byly použity

1) primární kultury lidských mesenchymálních buněk z kostní dřeně od dvou dárců (hBMSC-1 a hBMSC-2). Aspirát kostní dřeně byl zpracován gradientovou separací pomocí Gelofusinu, buňky byly vysety na 75 cm^2 kultivační láhve a neadherentní buňky odmyty po 24 hodinách kultivace. Adherentní buňky byly pěstovány s výměnou média dvakrát týdně a pasážovány při dosažení konfluence. Jejich status MSC byl ověřen pomocí diferenciací a hodnocení fenotypu, jak je popsáno výše (Turnovcova et al. 2009). Pro značení nanočásticemi byly použity kultivované hBMSC ve třetí pasáži.

Buňky byly značeny 72 h inkubací s částicemi Endorem®, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\text{PLL-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, manóza- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\text{PDMAAm-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLL-Endorem® a $\text{Endorem®} + \text{PLL}$. Částice byly přidávány v množství 15 $\mu\text{g Fe/ml}$ média. Po 72 h (interval 1) bylo kultivační médium odsáto a buňky dále pěstovány dalších 72 h v čerstvém médiu (interval 2). Neznačená kultura hBMSC byla souběžně pěstována za stejných podmínek a užita jako negativní kontrola.

2) primární kultury potkaních mesenchymálních buněk z kostní dřeně. Kostní dřev obsahující mesenchymální buňky byla získána výplachem z dlouhých kostí, supenze kostní dřeně v kultivačním médiu byla umístěna na plastické Petriho misky a non-adherentní buňky byly odmyty po 72

hodinách. Adherentní buňky byly expandovány s výměnou média dvakrát týdně a pasážemi při dosažení růstové konfluence. Ve 2 – 4 pasáži, při získání dostatečného množství buněk, byly přidány nanočástice Endorem®, FITC- γ -Fe₂O₃-CMCS, FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP a FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS v koncentraci 15 ug Fe/ml a inkubovány 72 hodin.

5.3.2.3. Úspěšnost značení

Značené a neznačené buňky inkubované s oběma typy SPIONs (fluorescenční a nefluorescenční) byly fixovány 4 % paraformaldehydem (PF) 20 minut a zpracovány na průkaz železa (vznik pruské modři). Jádra byla dobarvena pomocí hematoxylin-eosinu nebo jadrové červeně.

Obarvené buňky byly následně nasnímány pomocí invertovaného mikroskopu AxioObserver D.1 (v každém vzorku pět optických polí). Všechny buňky byly ručně označeny na základě jader v programu Jasc Paint Shop Pro 8 a dalším programem (MATLAB Software) bylo vyhodnoceno procento pozitivních (modrých) buněk a dále přítomnost (množství) modrého barviva v cytoplazmě každé buňky.

Obsah fluorescenčně značených SPIONs byl hodnocen nasnímáním vzorků na fluorescenčním mikroskopu Axioplan Imaging II.

Intracelulární lokalizace SPION Endorem®, γ -Fe₂O₃, PLL- γ -Fe₂O₃, manóza- γ -Fe₂O₃, PDMAAm- γ -Fe₂O₃, PLL-Endorem® a Endorem® + PLL byla zhodnocena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). hBMSC-2 byly inkubovány s nanočásticemi 72 h, poté přeneseny na sklíčka potažená PLL, fixovány 2,5 % glutaraldehydem v 0,1 molárním Sörensenově pufru 48 h při 4 °C a poté barveny 1 % oxidem osmičelým 2 h. Vzorky byly poté odvodněny v ethanolu, ponořeny do propylenoxidu a zality pryskyřicí (Epon 812) do želatinových kapslí. Po 72 h polymerizaci při 60 °C byly krájeny 60 nm ultratenké řezy, vloženy na sítčky a vyhodnoceny na transmisním elektronovém mikroskopu Philips Morgagni 268D.

5.3.2.4. Viabilita a buněčná smrt

Viabilita kultur hBMSC byla zhodnocena pomocí WST-1 testu, který je založen na štěpení přidané tetrazoliové soli na červený formazan v přítomnosti respirační činnosti živých soustav (aktivitou mitochondriálních dehydrogenáz). Buňky ve 3 pasáži byly vysety do 96 jamkových destiček v denzitě 2×10^3 na jamku a kultivovány s nanočásticemi Endorem®, γ -Fe₂O₃, PLL- γ -Fe₂O₃, mannose- γ -Fe₂O₃, PDMAAm- γ -Fe₂O₃, PLL-Endorem® a Endorem® + PLL ve stejném režimu, jako je popsáno výše. Po odmytí média s nanočásticemi a po další 72 h kultivaci v čistém médiu bylo přidáno 10 μ l WST-1

roztoku na 100 μ l kultivačního média a absorbance po 2 h inkubaci byla změřena na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm. Jako kontrola sloužila kultura neznačených hBMSC a jako blank bylo připraveno médium obsahující příslušné SPIONs a čisté médium. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako rozdíl absorbance mezi kulturami a blank médií.

Buněčná smrt byla analyzována pomocí barvení Annexin V/Propidium jodid. Vzorky buněk s nanočásticemi Endorem®, γ -Fe₂O₃, PLL- γ -Fe₂O₃, manóza- γ -Fe₂O₃, PDMAAm- γ -Fe₂O₃, PLL-Endorem® a Endorem® + PLL byly inkubovány s PI a annexinem V značeným FITC a proporce buněk živých (PI negativní, annexin V negativní), časně apoptotických (PI negativní, annexin V pozitivní) a pozdně apoptotických/mrtvých (PI pozitivní, annexin V pozitivní) byly zhodnoceny na průtokovém cytometru BD FACS Aria™.

5.3.2.5. Studie genotoxicity

Poškození DNA bylo studováno pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy (kometový test). Pro pokus byla použita alkalická verze testu, která umožňuje detekci jedno- a dvouřetězcových zlomů DNA. Ve stručnosti, hBMSC značené Endorem®, γ -Fe₂O₃, PLL- γ -Fe₂O₃, manóza- γ -Fe₂O₃, PDMAAm- γ -Fe₂O₃, PLL-Endorem® a Endorem® + PLL byly sklizeny v obou intervalech, rozsuspendovány v čerstvém médiu a umístěny na sklička (čtyři skla pro každý vzorek). Buňky byly nejprve lyzovány v lyzačním roztoku při pH 10. Po oplachu PBS byla dvě skla inkubována s FPG a endonukleázou III 1 h při 37 °C, další dvě skla inkubována pouze v pufru užitým pro ředění enzymů (0,1 mol KCl, 4 mmol EDTA, 2,5 mmol HEPES, 2 % BSA). Vzorky byly poté vloženy do alkalického pufru na 40 minut pro uvolnění DNA. Elektroforéza byla provedena v čerstvém alkalickém pufru na 20 minut. Vzorky byly na závěr neutralizovány v roztoku 0,4 mol Tris obsahujícím 0,005 % ethidiumbromid, opláchnuty destilovanou vodou, fixovány methanolem a usušeny při pokojové teplotě. Poté byla skla analyzována pomocí VANOX BHS fluorescenčního mikroskopu a množství uvolněné DNA bylo vyhodnoceno softwarem Lucia G 4.81. Výsledky byly uvedeny jako procento DNA vycestované do ohonu (Tail DNA %). Celkové poškození DNA (total DNA damage, enzymatické) a zlomy (DNA-SB, bez enzymů) byly počítány na 2 x 50 náhodně vybraných buňkách. Stupeň oxidativního poškození byl vyjádřen jako rozdíl mezi mediánem celkového poškození DNA a mediánem zlomů. Pro oba typy poškození DNA jsme tak získali na vzorek čtyři hodnoty, které byly užity pro statistickou analýzu.

5.3.2.6. Peroxidace lipidů a oxidace proteinů

Z hBMSC značených Endoremem®, γ -Fe₂O₃, PLL- γ -Fe₂O₃, manóza- γ -Fe₂O₃, PDMAAm- γ -Fe₂O₃, PLL-Endorem® a Endorem® + PLL sklizených v obou intervalech byl připraven lyzát a koncentrace proteinů v suspenzi byly změřena pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA).

Významným markerem oxidace proteinů jsou karbonylové skupiny >C=O vznikající oxidací z N-konce aminokyselin. Stupeň karbonylace proteinů lze stanovit a použít jako ukazatel oxidačního poškození těchto biomolekul. Většina testů detekujících karbonylové skupiny na proteinech je založena na derivatizaci karbonylových skupin pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH), kdy vzniká stabilní dinitrofenyl (DNP) hydrazon, který je stanovitelný četnými metodami (Dalle-Donne et al. 2003). Pro test oxidace buněčných proteinů byla zvolena metoda detekce DNP pomocí ELISA. Jako standard pro kalibrační křivku byl použit oxidovaný (pomocí H₂O₂) BSA.

Nejvýznamnějším produktem neenzymatické peroxidace lipidů volnými radikály je 15-F_{2t}-isoprostan vznikající z kyseliny arachidonové v buněčné membráně. Množství 15-F_{2t}-isoprostanu (15-F_{2t}-isoP) je indikátorem oxidačního stresu *in vivo*. 15-F_{2t}-isoP byl hydrolýzou v alkalickém prostředí uvolněn z buněčné membrány a ze suspenze izolován vazbou na specifický sorbent. Po uvolnění ze sorbentu a získání 15-F_{2t}-isoP byla poté stanovena koncentrace pomocí ELISA.

5.3.2.7. Testy *in vivo*

100 000 rMSC inkubovaných s FITC- γ -Fe₂O₃-CMCS po 72 hodin bylo podáno do temporoparietálního kortexu potkana. Buňky byly sklizeny, rozsuspendovány v PBS a pod 2 % isofluranovou anestézií podány intracerebrálně po návrtu lebky. Objem implantátu byl 3 μ l. Potkan poté podstoupil vyšetření na MRI přístroji Bruker Biospec 4,7 T. Získány byly sagitální, koronální a transverzální obrazy pomocí T2-vážených turbo-spin echo sekvencí. Parametry sekvencí byly: repetiční čas TR = 3000 ms, echo time = 36 ms, matrice 256 x 256 bodů, FOV = 3,5 x 3,5 cm a tloušťka řezu 0,75 mm. Po ukončení snímkování byla provedena perfúze zvířete 4 % paraformaldehydem a mozková tkáň připravena pro histologickou analýzu barvením na železo a nativní řezy pro detekci FITC.

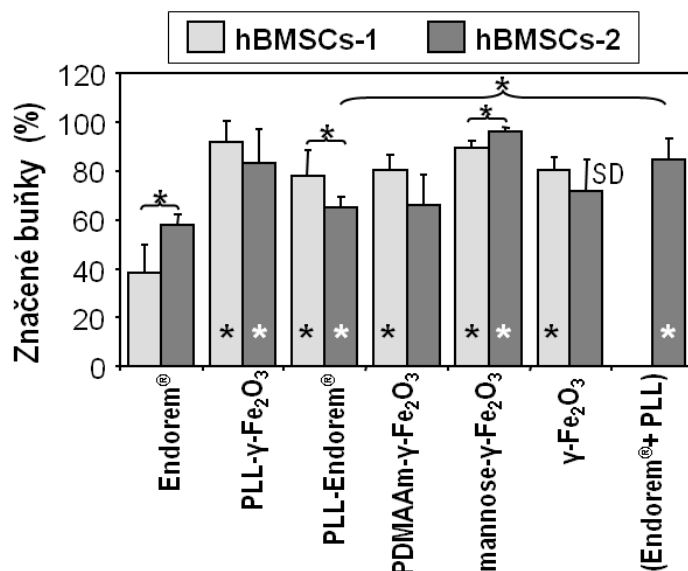
5.3.2.8. Statistika

Pro vyhodnocení statistické významnosti byla stanovena hodnota $p < 0,05$. Získané výsledky byly podrobeny testu ANOVA a nepárovému Studentovu t-testu. Viabilita byla zhodnocena pomocí chí-kvadrát testu. Data byla analyzována pomocí programu Origin.

5.3.3. Výsledky

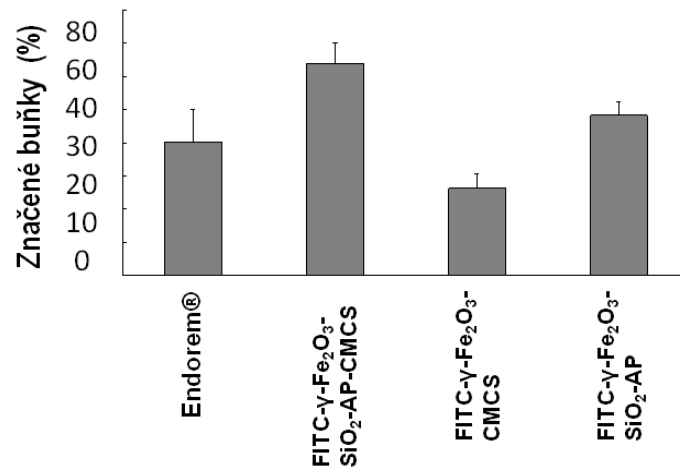
5.3.3.1. Efektivita značení nanočásticemi

Transmisní elektronová mikroskopie potvrdila příjem nanočástic buňkami (obr. 23). Nanočástice Endorem®, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLL- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, manóza- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PDMAAm- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PLL-Endorem® a Endorem®+ PLL byly nalezeny v cytoplazmě buněk ohraničené membránou v lysozómech nebo i volně. Dvě kultury, pocházející od dvou dárců, ovšem vykazaly odlišné množství příjmu částic (obr. 20). Nejmenší úspěšnost značení po vyhodnocení vzniku pruské modři vykázal komerční přípravek Endorem®. Zejména ve vzorku od prvního dárce (hBMSC1) byl překonán všemi zkoumanými typy SPIONs včetně neobaleného maghemitu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Přes podobný trend nebyly rozdíly ve druhém vzorku významné. Transfekční činidlo PLL zlepšilo úspěšnost značení Endoremem a zvýšilo účinnost příjmu Endoremu®. V případě přidaného volného PLL v suspenzi byla úspěšnost vyšší, než v případě Endoremu® obaleného PLL.

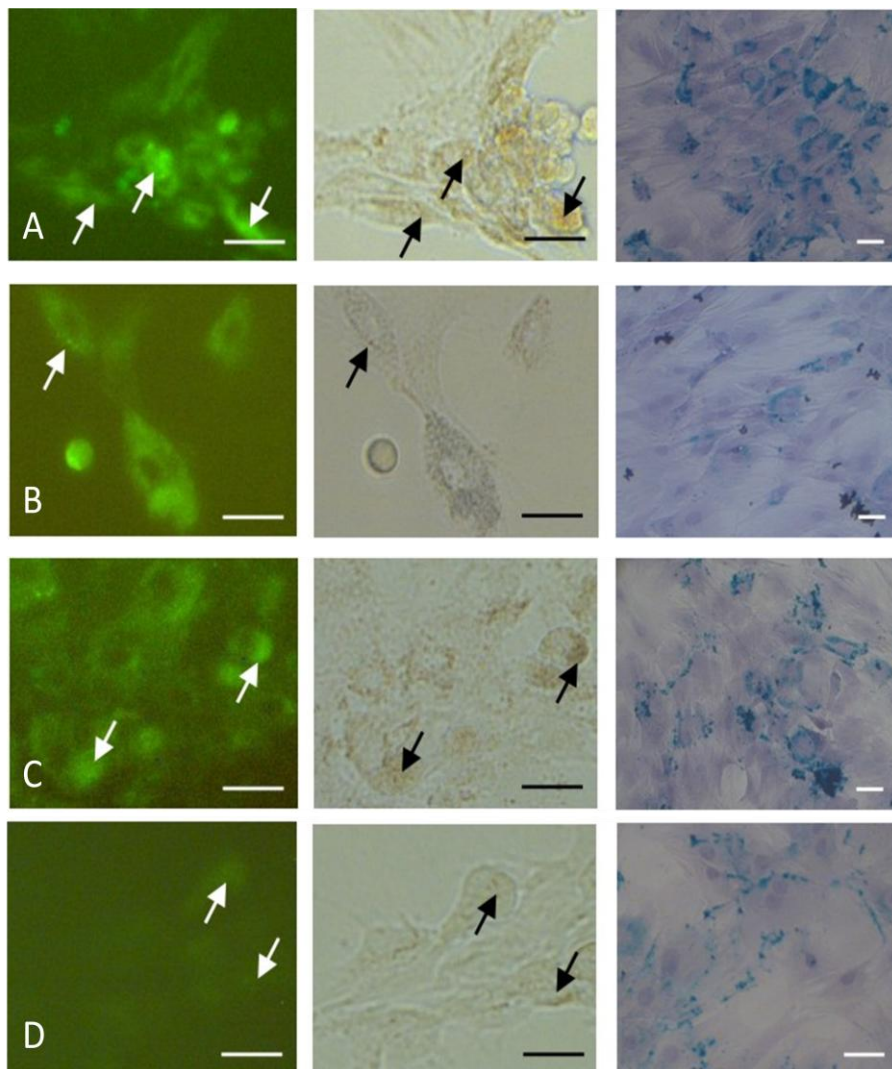


Obr. 20: Úspěšnost značení hBMSC různými typy SPIONs na základě barvení pruskou modří. SD – směrodatná odchylka, * $p < 0,05$. Hvězdička značí signifikantní rozdíl mezi zkoumanými nanočásticemi a komerčním Endoremem®, černá hvězdička – hBMSC1, bílá hvězdička – hBMSC2.

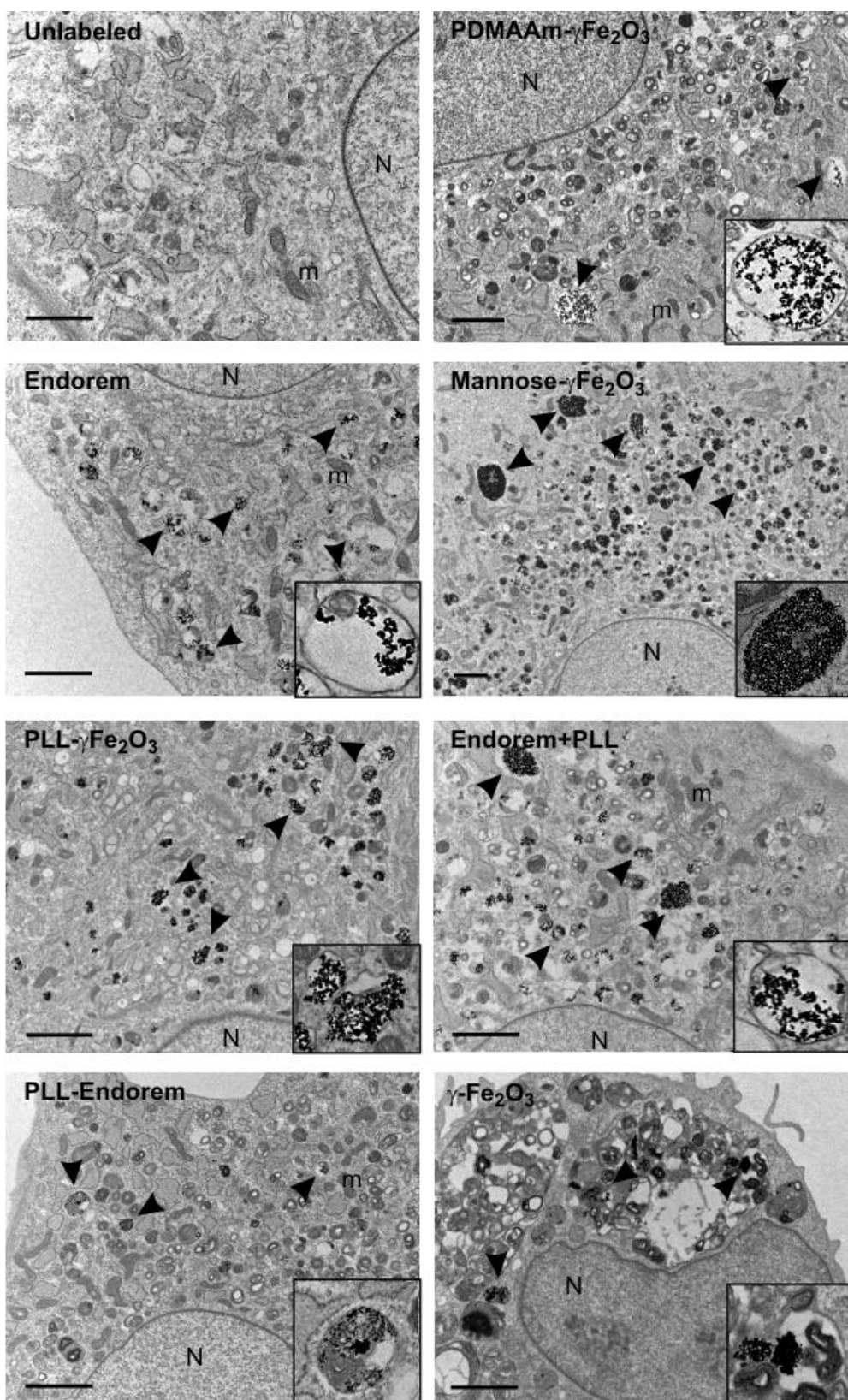
Při testování fluorescenčních SPIONs, FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -CMCS, FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -SiO₂-AP a FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -SiO₂-AP-CMCS byly nejlepší výsledky získány v případě FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -SiO₂-AP-CMCS (66 % pozitivních buněk). FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -SiO₂-AP dosáhl 48 % pozitivity, což je srovnatelné s Endoremem® (40 %). Nejnižší úspěšnost značení byla pozorována v případě FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -CMCS (26 %) (obr. 21). Na fluorescenčních snímcích je prokazatelný pozitivní signál ve stejné lokalizaci jako hnědě zbarvená depozita SPIONs pozorovatelná na světelném mikroskopu (obr. 22). Barvení na železo dalo pozitivní výsledky vznikem pruské modři. Autofluorescence byla vyloučena souběžným značením nefluorescenčním Endoremem®, kde není zelený signál pozorovatelný.



Obr. 21: Úspěšnost značení hBMSC různými typy SPIONs na základě barvení pruskou modří.



Obr. 22: Levý sloupec: fluorescenční skeny rMSC značených (A) FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS, (B) FITC- γ -Fe₂O₃-CMCS, (C) FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP a (D) Endoremem®. Střední sloupec – světelné snímky stejných buněk jako vlevo. Měřítka 50 μ m. Pravý sloupec – průkaz železa pruskou modří. Měřítka 20 μ m.



Obr. 23: TEM snímky neznačených a značených hBMSC-2. Šípky vyznačují shluky nanočástic v endozómech/lysozómech a v cytoplazmě. Výřezy ukazují shluky nanočástic obalené membránou. N – jádro, M – mitochondrie. Měřítko 2 μm.

5.3.3.2. Viabilita buněk

Viabilita buněk byla hodnocena pomocí WST-1 testu. Výsledky shrnuje obr. 24. Ve vzorku hBMSC1 byla viabilita buněk byla snížena pouze v kultuře s PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃, což byly ovšem vzorky s nejvyšší úspěšností značení. Po další kultivaci v čistém médiu (interval 2) tento rozdíl mizí.

HBMSC2 vykazala větší senzitivitu k testovaným SPIONs, zejména neobalené γ -Fe₂O₃ a PLL- γ -Fe₂O₃. Ačkoliv úspěšnost značení byla srovnatelná v obou vzorcích, po 72 h kultivaci jsme zjistili významně redukovanou viabilitu (50 % pokles) u těchto SPIONs, která přetrvávala i ve druhém intervalu po promytí čistým médiem. Ostatní vzorky, zejména Endorem®, manóza- γ -Fe₂O₃ a Endorem®+ PLL, vykazaly stejný pokles viability i po výměně média, byť pokles nebyl tak strmý (68 – 70 % kontrolního vzorku).

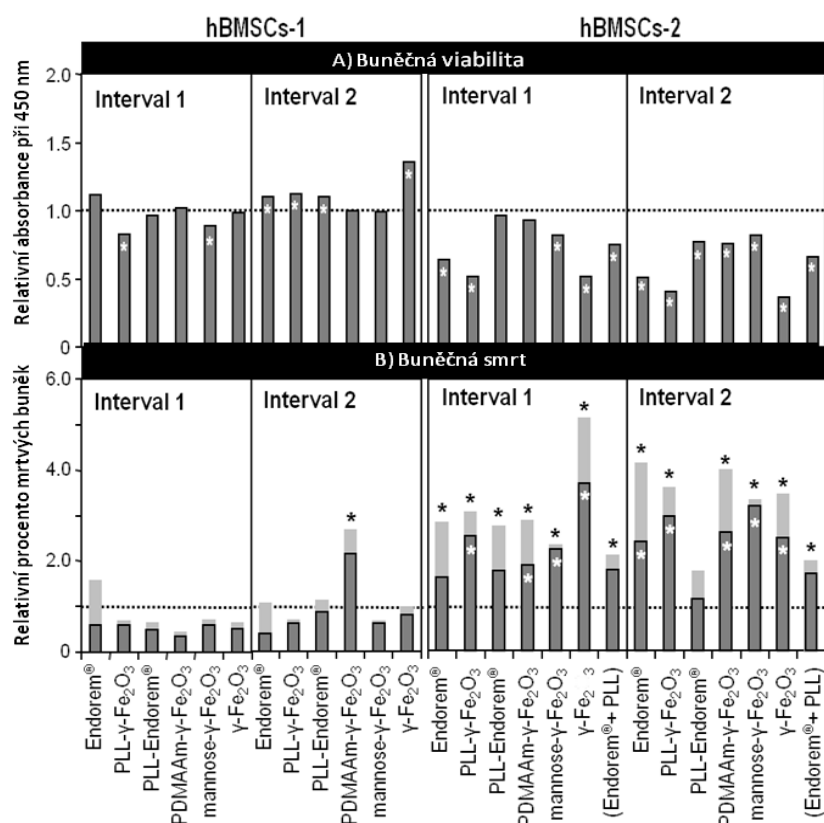
5.3.3.3. Buněčná smrt

Buňky byly značeny annexinem V FITC a propidiumjodidem a analyzovány na průtokovém cytometru. Buňky hBMSC1 vykazaly v obou intervalech pouze zanedbatelné množství usmrcených buněk, bez ohledu na typ SPIONs. Pouze po korekci na 100 % úspěšnost značení buněk vykázal vzorek s PDMAAm- γ -Fe₂O₃ signifikantní zvýšení počtu mrtvých buněk, přesto tento počet reprezentoval pouhých 4 %.

Buňky hBMSC2 i zde vykazaly vyšší citlivost ke značení pomocí SPIONs. V intervalu 1 vzrostlo procento mrtvých buněk na 7 % (Endorem®) a 17 % (nepotažený γ -Fe₂O₃). Nanočástice Endorem® vykazaly nejnižší toxicitu. Při korekci na 100 % úspěšnost značení zde nebyl pozorován žádný rozdíl v toxicitě částic, která však v průměru vzrostla na 23 %. Tyto hodnoty byly získány i ve druhém intervalu po výměně média, kdy nejnižší toxicity dosáhl PLL-Endorem® a nejvyšší PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃, kdy po korekci hodnot se jako nejtoxičtější ukázal Endorem® a PDMAAm- γ -Fe₂O₃ (tab. 8).

5.3.3.4. Poškození DNA

Výsledky kometových testů shrnuje obr. 25. V pokusu s hBMSC1 vychází Endorem® jako nejbezpečnější částice, při korelaci na 100 % účinnost se však ukazuje jako nejgenotoxičtější částice vůbec. Všechny částice vykazují genotoxicitu překračující kontrolní hodnotu a s výjimkou manóza- γ -Fe₂O₃ se genotoxicita dále zvyšuje ještě i v intervalu 2. I zde však manóza- γ -Fe₂O₃ překračuje signifikantně (2,7krát) kontrolní hodnotu.



Obr. 24: Viabilita (A) a buněčná smrt (B). Data jsou vztažena ke kontrolním vzorkům (hBMSC bez SPIONs), které představuje tečkovaná čára. Šedé prodloužení sloupců představuje hypotetickou korelaci buněčné smrti ke 100 % úspěšnosti značení buněk SPIONs. Bílé hvězdičky představují signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolami, černé buněčnou smrt při hypotetické 100 % úspěšnosti značení.

Druh SPIONs	Procento mrtvých buněk (%)							
	hBMSCs-1				hBMSCs-2			
	Interval 1		Interval 2		Interval 1		Interval 2	
	Časná apoptóza	Pozdní apoptóza + nekróza	Časná apoptóza	Pozdní apoptóza + nekróza	Časná apoptóza	Pozdní apoptóza + nekróza	Časná apoptóza	Pozdní apoptóza + nekróza
Neznačená kontrola	2.00	3.70	0.30	1.20	1.60	2.90	1.60	4.10
Endorem®	0.70	2.70	0.30	0.30	1.80	5.60	3.40	10.30
PLL-γ-Fe ₂ O ₃	2.30	1.10	0.30	0.60	3.90	7.50	3.90	13.10
PLL-Endorem®	0.50	2.30	0.30	1.00	2.20	5.80	0.80	5.70
PDMAAm-γ-Fe ₂ O ₃	1.00	0.90	0.60	2.60	3.20	5.30	3.80	11.20
Manóza-γ-Fe ₂ O ₃	1.90	1.50	0.30	0.60	5.20	4.90	6.60	11.60
(Endorem® + PLL)	nd	nd	nd	nd	2.10	6.00	1.70	8.00
γ-Fe ₂ O ₃	1.90	1.00	0.60	0.60	5.80	10.80	3.00	11.20

Tab. 8: Analýza buněčné smrti pomocí FACS, buňky barvené annexinem V FITC a PI. Časná apoptóza – buňky pozitivní pouze pro annexin V, pozdní apoptóza a nekróza – buňky současně pozitivní pro annexin V a pro PI.

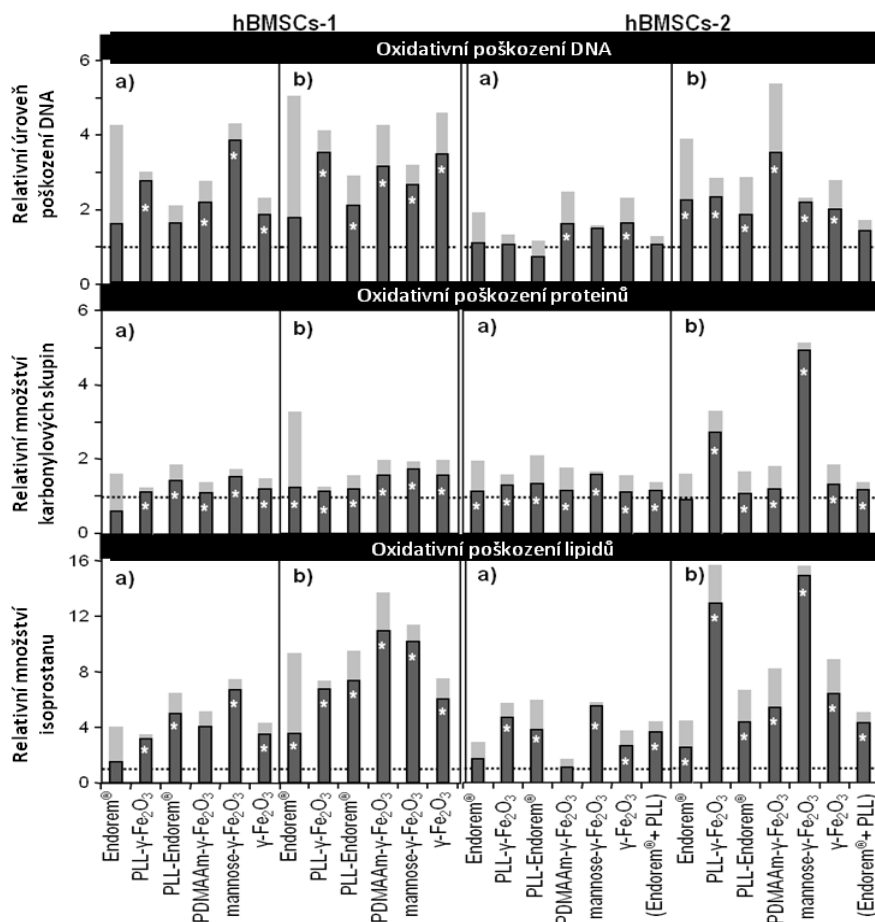
U vzorku hBMSC2 pouze γ-Fe₂O₃ a PDMAAm-γ-Fe₂O₃ zvyšují procento poškozené DNA v intervalu 1. V intervalu 2 byl pozorován nárůst poškozené DNA u všech vzorků s výjimkou Endorem® + PLL,

kde byla genotoxicita srovnatelná s kontrolami. Přesto se Endorem® a PDMAAm- γ -Fe₂O₃ jeví být nejgenotoxičtějšími částicemi vůbec, zejména po korekci na 100 % účinnost značení.

5.3.3.5. Oxidativní poškození proteinů a lipidů

Oxidativní poškození proteinů signifikantně překročilo kontrolní hodnoty u obou vzorků v obou intervalech a bez ohledu na typ SPIONs (obr. 25). Zatímco u hBMSC1 byl oxidativní efekt u všech částic srovnatelný, u hBMSC2 se jako nejtoxičtější jevila manóza- γ -Fe₂O₃, kdy došlo ve druhém intervalu ke téměř pětinasobnému zvýšení hodnot v počtu karbonylových skupin ve srovnání s kontrolami.

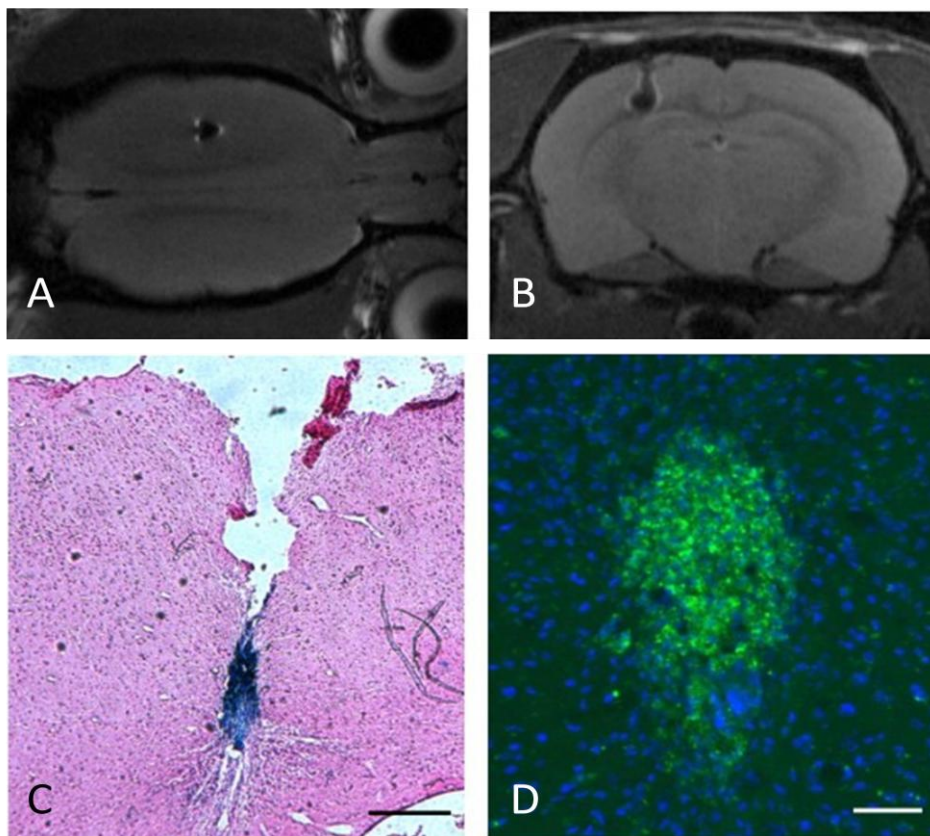
Obě kultury se ukázaly být susceptibilní k oxidačnímu poškození lipidů SPIONy, přestože efekt Endoremu® a PDMAAm- γ -Fe₂O₃ se projevil až ve druhém intervalu. U obou kultur bylo shodně nalezeno vyšší množství 15-F_{2t}-isoP ve druhém intervalu ve srovnání s prvním. U hBMSC1 se jako SPION s nejsilnějším efektem na produkci 15-F_{2t}-isoP projevil PDMAAm- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃, zatímco u hBMSC2 PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃.



Obr. 25: Oxidativní poškození makromolekul v hBMSC různými typy SPIONs. Srovnání kultur od obou dárců v intervalu 1 (a) a intervalu 2 (b). Data jsou vztažena ke kontrolním vzorkům (hBMSC bez SPIONs), které představuje tečkovaná čára. Šedé prodloužení sloupců představuje hypotetickou korelaci buněčné smrti ke 100 % úspěšnosti značení buněk SPIONs.

5.3.3.6. Testy *in vivo*

Potkaní MSC (100 000 b.) značených FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS bylo implantováno do potkaního mozku ve 3 μ l PBS. Implantát byl dobře pozorovatelný na axiálních i koronálních řezech jako hyposignální bod ohraničený proti okolní tkáni. Histologie potvrdila depozita železa barvením na pruskou modř a zelenou fluorescenci v totožné lokalizaci (obr. 26).



Obr. 26: Koronální (A) a axiální (B) MRI řezy potkaního mozku s implantovanými 100 000 rMSC značenými FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS. Implantát byl potvrzen vznikem pruské modři (C) a zelenou fluorescencí (D). Zelená barva – FITC, modrá – DAPI. Měřítka (C) 0,5 mm a (D) 50 μ m.

5.3.4. Závěr

Nejnižší úspěšnost v intracelulárním značení vykázal komerční přípravek Endorem®, zatímco PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃ byly nejúspěšnější mezi zkoumanými nanočásticemi (uptake mezi 80 – 100 %). Úspěšnost značení závisela také na dárcovské kultuře, kdy se u částic PLL- γ -Fe₂O₃, PDMAA- γ -Fe₂O₃ a Endorem® u vzorku hBMSC1 pohybovala v úrovni 90 %, 80 % a 38%, kdežto u vzorku hBMSC2 dosáhla 83 %, 66 % a 58 %. Donorem byla ovlivněná i viabilita buněk a úroveň buněčné smrti, přičemž obě veličiny byly závislé také na úspěšnosti značení. U hBMSC1 byla úroveň buněčné smrti nejvyšší u nejúspěšnějších SPIONs PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃ a šlo pouze o transientní narušení viability, u hBMSC2 byla viabilita narušena všemi nanočásticemi v obou intervalech, kdy se vliv nanočástic na viabilitu projevil výrazně po přepočtu na 100 % úspěšnost značení. Genotoxicita byla pozorována u všech nanočástic a to v obou intervalech a u obou vzorků. Stejně výsledky dávaly testy oxidativního poškození proteinů. Peroxidace lipidů byla pozorovatelná u obou vzorků a byla akcentována v intervalu 2. Souhrnně, nejvyšší poškození buněk bylo pozorováno u částic s nejvyšší úspěšností značení, při přepočtu na 100 % úspěšnost značení byly výsledky srovnatelné.

Fluorescenčně značené SPIONs byly detekovatelné intracelulárně, nejvyšší úspěšnost prokázala částice FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS. Implantát rMSC inkubovaný s částicemi FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS byl dobře vizualizován pomocí MRI a histologicky potvrzen v mozku na základě zelené fluorescence.

6. Obecná diskuse

Úvodní část práce představuje výsledky transplantace hESC-NPs a hiPS-NPCs do potkaního mozku v subakutní fázi experimentální lokální ischemie. V první části studie jsme představili diferenciaci hESC do neurálního a neuronálního fenotypu, snížení tumorigenicity a přežití transplantátu *in vivo*. Eliminace tumorigenicity byla dosažena prodlouženou kultivací buněk *in vitro* v diferenciacním médiu. Transplantace nediferencovaných hESC sice vedla ke 100 % přežití transplantátu, ale také ke 100 % tumorigenitě nebo hyperproliferaci buněk. Tyto buňky dále nebyly schopné migrovat a vytvářet funkční zapojení, jejich činností byl invazivní růst. Imunohistochemicky byla zjištěna exprese pluripotentních markerů typických pro nediferencované embryonální buňky: sox2, oct3/4, nanog, SSEA-4 a TRA-1-60. Pozitivita těchto markerů byla potvrzena také průtokovou cytometrií. Průtoková cytometrie navíc odhalila nízkou až střední expresi neuroektodermálních markerů SSEA-1, nestinu a beta-III-tubulinu, které při imunohistochemickém barvení vyšly jako negativní nebo se exprese objevila jen v jednotlivých buňkách (SSEA-1). SSEA-1 je marker typický pro myší embryonální buňky a během diferenciacce mizí, avšak výsledky dalších prací svědčí pro možnou expresi SSEA-1 i u nediferencovaných lidských embryonálních buněk v závislosti na buněčné linii, stejně jako se mohou objevit i další markery považované za typické pro vývojová stadia buněk nebo některý typický marker může chybět (Adewumi et al. 2007). Imunohistochemická negativita a cytometrická pozitivita na beta-III-tubulin a nestin může být způsobena vyšší senzitivitou průtokové cytometrie proti imunohistochemii.

Naše výsledky ukázaly 50 % snížení tumorigenicity po transplantaci hESC-NPs pásáže ve srovnání s nediferencovanými buňkami a pásáží 1. Přežití graftu bylo podobné jako v předchozích skupinách (přežilo 10 z jedenácti graftů). Rozdíl spočíval v kompletním snížení exprese pluripotentních markerů (sox2, oct3/4, nanog, SSEA-4, TRA-1-60). Buňky byly pozitivní na neuroektodermální markery (NCAM, beta-III-tubulin, nestin, CD271, NF70, CD29). Přesto tyto buňky zachovávají proliferační kapacitu a negativita pluripotentních markerů neposkytuje úplnou ochranu před možným růstem tumoru.

Nejlepší výsledky nabízí hESC-NPs pásáže 8. Během tří měsíců sledování osudu transplantovaných buněk nebyl zjištěn nádorový růst ani hyperproliferace, většina graftů (7 z 8) přežila tři měsíce a u pěti z těchto sedmi přeživších graftů byly nalezeny buňky migrující tkání obklopující lézi. Imunohistochemická analýza odhalila pozitivitu transplantovaných buněk na NSE, NCAM a nestin. Není zatím úplně jasné, zda by byly tyto buňky schopné dále diferencovat do neuronálního fenotypu, tříměsíční perioda pozorování nebyla patrně pro další vyzrávání implantovaných buněk dostatečná.

Rozdíly mezi hESC-NPs P5 a P8 spočívaly v rozdílné expresi CD24, SSEA-1/CD15 a CD133. Exprese CD24 a SSEA-1 u buněk pásáže 8 klesla z téměř 30 % k negativitě (5 – 7 %), zatímco CD133

se zvýšila z 30 % na cca 80 %. Podle různých autorů (Pruszek et al. 2007; Panchision et al. 2007) jsou tyto markery typické pro postupný proces zrání buněk od nediferencovaných buněk přes neurální kmenové buňky k neuronálním prekursorům a jejich exprese je klíčová pro určení vývojového stadia neurálních prekursorů. CD24 je exprimována na vyvíjejícím se myším mozku a to i postnatálně v zónách sekundární neurogeneze (čichové bulby, c. callosum a subventrikulární zóna postranních komor) (Calaora et al. 1996). Pruszek a spolupracovníci (Pruszek et al. 2007, 2009) navrhuje marker CD24 za znak určující a s přetrvávajícím významem pro neurální a neuronální diferenciaci *in vitro*, kdy buňky exprimující CD24 a negativní pro CD29 jsou bezpečné z hlediska proliferace a tumorigenicity. Naopak naše nálezy ukazují, že pokles exprese CD24 je spojen s poklesem nebezpečí tvorby tumoru. CD24 je považovaný za znak důležitý pro neurální kmenovou buňku a neurální prekursor žádoucí pro uchycení buňky a migraci v tkáni (Aigner et al. 1997), avšak další výsledky (Tingling et al. 2013) naznačují větší vulnerabilitu buněk exprimujících CD24 k malignímu zvratu ve srovnání s CD24-negativními prekursori.

CD133 (prominin-1) je přítomný na povrchu vyvíjejících se buněk nejrozumnějšího původu, nejen neurálního. CD133 nalézáme na membráně neuroepiteliálních buněk tvořících rozetovité formace, podobně jako v *in vivo* se vyvíjejících se neuroepiteliálních buňkách (Marzesco et al. 2005). CD133 byl identifikován jako jeden z nejsolidnějších markerů neurálních kmenových buněk během vývoje (Wang et al. 2013) a identifikuje také neurální kmenové nádorové buňky (Wang et al. 2008). CD133 je dočasný marker vyskytující se pouze v časově omezeném období neurálního vývoje na začátku diferenciaci a ve stadiu časných neurálních prekursorů (Pruszek et al. 2007), ačkoliv může na buňkách exprimujících nestin přetrvávat celou dobu diferenciaci a mizí až na terminálních neuronech (Kania et al. 2005). Naše výsledky ukazují vzestup pozitivitu CD133 v pasáži 8 s prodlužující se dobou kultivace, který byl spojen s poklesem proliferace a tumorigenicity.

Dalším markerem, který vykazoval mezi P5 a P8 změny, je SSEA-1/CD15/LeX. Pozitivita SSEA-1 klesla z 30 % k negativitě (5 %). SSEA-1 se objevuje v mozku během neurogeneze na vyvíjejících se astrocytech a neuronech (Panchision et al. 2007), kdy se zřejmě uplatňuje v jejich migraci a v postnatálním mozku je jeho exprese omezena na oblasti se sekundární neurogenézou. SSEA-1 je exprimována i na glioblastomových buňkách, kde jeho exprese negativně koreluje s gradingem nádoru (Gocht et al. 1996). Tato časově omezená exprese je popisována i na vyvíjejících se neurálních kmenových buňkách *in vitro* (Pruszek et al. 2007) a *in vivo* a SSEA1 je downregulovaný u neuronálních prekursorů (Pruszek et al. 2009), přičemž vývoj neurosfér a exprese neuroektodermálních markerů jsou možné i na buňkách neexprimujících SSEA-1, avšak pozitivních na CD133 (Peh et al. 2009).

Celkově můžeme říci, že hESC-NPs CCT14 bezpečné pro transplantaci *in vivo* jsou buňky s profilem CD133^{hi}/CD24^{lo}/CD15^{lo}. Přesto, z pohledu prací zabývajících se fenotypem neurálních prekursorů *in*

vivo (Panchision et al. 2007), kde se za zásadní považují neurální prekursorů s fenotypem CD133^{hi or lo}/CD24^{hi}/CD15^{hi or lo} a při srovnání s vývojově pokročilejšími vlastnostmi a fenotypem dalších typů neurálních prekursorů (hiPS-NPCs, případně SPC-01) nejde o optimální stav, kdy prodloužená kultivace vede k nízké expresi CD24 a CD15, která je na této úrovni buněčného vývoje sice markerem žádoucího poklesu tumorigenicity, avšak prodloužená kultivace ovlivňuje buňky i negativně, dochází ke změnám diferenciační kapacity a růstu nezávislém na růstových faktorech (Nguyen et al. 2013).

Transplantace hESC-NPs P10 byla zcela bezpečná, co se týče tvorby tumorů, avšak přežití těchto graftů bylo významně nižší, než v předchozí skupině (přežilo pouze 5 z osmi transplantátů). HESC-NPs P10 neproliferovaly, ale přežití buněk transplantátu bylo velmi slabé, i v případě nalezených buněk byl jejich počet velmi nízký a jejich migrace omezená. Profil buněk před transplantací se nelišil významně od těch z pasáže 8, s dvěma výjimkami: exprese CD271 klesla o polovinu (z >80 % v pasáži 8 k 40 % v pasáži 10). CD271/p75 je nízkoafinitní receptor pro neurální růstový faktor (lowNGFR) a je klíčový pro normální vývoj neurální tkáně. CD271 kromě NGF může vázat ještě jiné neurotrofiny (BDNF, NTF3, NTF4), funkce a biologické účinky jsou rozsáhlé (proliferace, migrace, diferenciace, přežívání, apoptóza) (Bartkowska et al. 2010). Pokles pozitivitu CD271 byl pozorován současně s poklesem proliferační kapacity buněk *in vitro* mezi 8. a 10. pasáží.

Dalším markerem, který prodělal mezi P5 a P8 změnu (neuváděný v textu), byl HLA-ABC. Nediferencované hESC jsou imunologicky privilegované a jejich exprese HLA-ABC je nízká, po počátku diferenciace se začne zvyšovat (Drukker a Benvenisty 2004). Nediferencované hESC exprimovaly HLA-ABC kolem 15 %, po zahájení diferenciace se exprese zvýšila na 20 % v P5, na 63 % v P8 a na 88,5 % v P10. Tato míra exprese již byla zřetelně hraniční pro přežití graftu po transplantaci. Tyto nálezy nasvědčují nízké přežití graftu z důvodu omezení proliferační kapacity *in vitro* a vysoké imunogenicity buněk v pasáži 10.

V mnoha předložených pracích byly prezentovány důkazy pro aktivaci endogenních zdrojů po ischemickém inzultu (Borlongan a Hess 2006; Madhavan et al. 2009; Chopp et al. 2009; Shen et al. 2010). V naší práci byly po transplantaci hESC-NPs nalezeny endogenní (hostitelského původu) aktivované elementy v oblasti léze a rozptýlené v celé pravé hemisféře.

Dále představujeme terminální diferenciaci hESC-NPs do terminálních funkčních neuronů. Za dva týdny po započetí terminální diferenciace byly buňky morfologicky a imunohistochemicky charakterizovány jako nezralé neurony. Během dalších dvou týdnů byl definitivní maturační proces potvrzen elektrofyzilogicky a imunohistochemicky. Po čtyřech týdnech diferenciačního procesu začaly terminální neurony kumulovat neurotransmitery GABA a glutamát. A třebaže jsme zjistili, že dlouhodobá kultivace v diferenciačním médiu snižuje nebezpečí tvorby tumoru, tato prodloužená propagace také negativně ovlivňuje výsledek terminální diferenciace. HESC-NPs z pasáže 8 dávaly ve

výsledku nižší procento neuronálních buněk a vyšší procento gliových buněk ve srovnání s prekurzory z P1, což je ve shodě s nálezy Ercega a kolegů (Erceg et al. 2009).

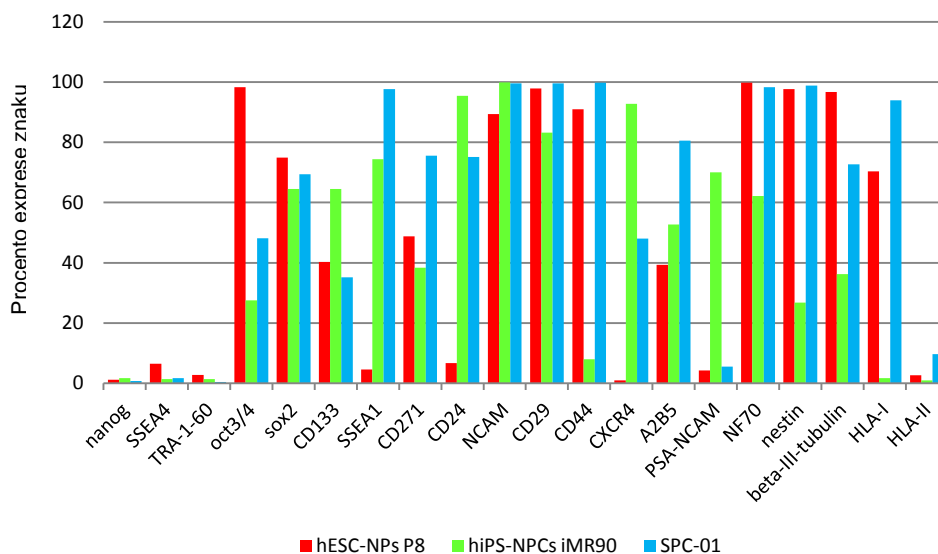
Diferenciace založená na indukci diferenciace inhibitorem BMP nogginem je reportována jako nestabilní. V kultuře jsou buňky exprimující pluripotentní markery detekovány ještě po čtrnáctidenní inkubaci *in vitro* (Peh et al. 2009), což je způsobeno opožděnou odpovědí částí buněk na diferenciální stimulus (Pruszak et al. 2007). Ve námi prezentovaném experimentu nebyl potvrzen významný podíl přetrvávajících pluripotentních buněk popisovaný Pruszakem a kolegy, avšak další diferenciace nasvědčovaly heterogenitě vzorku s přetrváním exprese pluripotentních markerů u části buněk a to v kolísajícím procentu během pasáží. Na rozdíl od výsledků Pruszaka a jeho kolegů tyto buňky koexprimovaly zároveň pluripotentní znaky a markery neuroektodermální diferenciace (v pasáži 1 SSEA-4 a NCAM více jak 80 %), což znemožnilo užít NCAM jako pozitivní znak pro purifikaci kultury pomocí FACS. Dále, nejvýraznější koexprese NCAM a přetrvávajících pluripotentních znaků (nanog, SSEA-4) byla nalezena v pasáži 1 a přetrvávala do pasáže 4, což by mohlo nabízet vysvětlení pro 100 % tvorbu tumoru u transplantovaných hESC-NPs P1, ačkoliv tyto buňky byly imunohistochemicky potvrzeny jako neuroektodermální progenitory exprimující beta-III-tubulin, nestin a NCAM.

Neurální prekurzory derivované z indukovaných pluripotentních buněk byly diferencované pomocí odlišného protokolu. Indukce diferenciace je založena na duální inhibici signální kaskády TGFbeta/activin/nodal inhibicí SMAD molekuly inhibitorem SB431542 a inhibicí BMP pomocí nogginu (Kim et al. 2010; Morizane et al. 2011). Velkým přínosem této cesty je rychlý získání homogenní populace NPCs po 5 – 7 dnech diferenciace. Snaha získat co nejčistší populaci neurálních či neuronálních prekurzorů umožňující se vyhnout purifikaci je v současnosti zastoupena dalšími zprávami o diferenciaci neuronálních prekurzorů o vysoké čistotě bez užití nogginu, kdy se neurální rozety připravují v neadherentních peletách za přítomnosti kyseliny retinové (indukce diferenciace) a přidavku BDNF a GDNF (neuronální diferenciace) (Nistor et al. 2011).

Další úroveň požadovaná v buněčné terapii “replacement” je kromě přežití a migrace štěpu založena na schopnosti implantovaných prekurzorů vyvinout se do požadovaného typu specifického pro danou lokalizaci. Při experimentálním iktu pomocí intraluminální okluze a. cerebri mediae dochází k masivní ztrátě středních projekčních GABAergních neuronů striata, vedoucí k porušení okruhu substantia nigra – striatum. Transplantované hiPS-NPCs vyžrávaly v projekční GABAergní neurony charakterizované dopaminergním receptorem D1 spáženým s druhým poslem DARPP-32. Měsíc po transplantaci byly transplantované buňky pozitivní na nestin, sox2, pax6 a negativní na oct3/4. Za další tři měsíce představovaly implantované buňky plně zformované DARPP-32 pozitivní neurony, kalretinin-pozitivní interneurony a malou proporcii neuronů s receptorem typu D2. Část implantovaných buněk byla pozitivní na GFAP. Ve srovnání s předchozím typem prezentovaných buněk, hESC-NPs CCT14

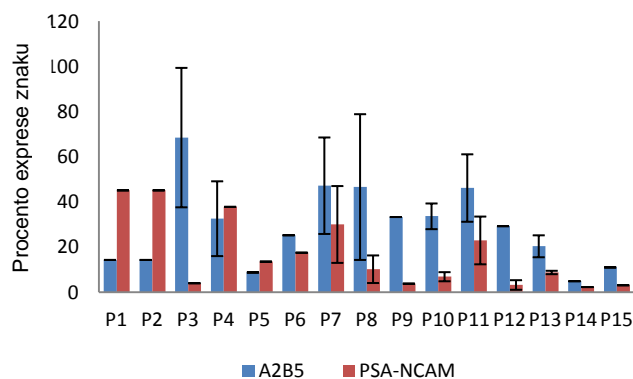
z neúspěšnější pasáže (P8), hiPS-NPCs *in vivo* dosáhly za 4 měsíce pokročilejšího vývojového stupně v procesu neuronálního vývoje. Cytometrická analýza v rozšířeném panelu prováděná preimplantačně odhalila rozdíly, které mohou poskytnout vysvětlení pro odlišný výsledek dosažený u obou druhů buněk. Oba typy transplantovaných buněk exprimují NCAM, nestin, NF70, beta-III-tubulin a jsou negativní na nanog, SSEA-4, TRA-1-60, obdobná exprese se objevuje u sox2 a oct3/4, které po transplantaci mizí. Oba typy prekurzorů shodně exprimují CD29, beta-1-integrinový receptor. Integrinové receptory jsou důležité pro vývoj a migraci neurálních prekurzorů a jejich maturaci (Hall et al. 2006).

Rozdíly však byly pozorované v expresi specifických neurálních vývojových markerů A2B5 a PSA-NCAM. PSA-NCAM, neurální adhezí molekula modifikovaná navázanou polysialovou kyselinou je považována za vymezující budoucí neuronální prekurzory, A2B5 charakterizuje prekurzory buněk gliových a v dalším vývoji se objevuje na zrajících oligodendrocytech a astrocytech typu 2, kde jeho exprese klesá s dosaženou zralostí. Vývojově se oba markery vyskytují na rostoucích neuroepitelových buňkách, přičemž se objevují buňky exprimující pouze jeden z těchto markerů, stejně jako buňky double-pozitivní (Lipnick a Jacobson 2006) a v dospělém mozku je možno najít v zónách se zachovanou neurogenézí. Calaora a kol. (Calaora et al. 1996) charakterizuje místa s vysokou expresí CD24 – místa s neurogenézou – jako také s vysokou expresí PSA-NCAM. Významná je stabilní vysoká přítomnost obou těchto markerů u hiPS-ENPs a hiPS-NPCs, zatímco u hESC-NPs se v P8 objevuje slabá (< 40 %) exprese A2B5 a PSA-NCAM je negativní. Další analýza osudu implantovaných prekurzorů odhalila menší podíl nově zformovaných astrocytů (GFAP-pozitivní MTC02-pozitivní) v transplantátu hiPS-NPCs v míše (Romanyuk et al. 2014) proti implantovaným SPC-01 (Amemori et al. 2013), které mají podobně jako hESC-NPs negativní PSA-NCAM, ale vysokou expresi A2B5 (obr. 27). Další pohled poskytují výsledky A2B5 a PSA-NCAM u hESC-NPs (analyzované během následných prací), kdy se během dlouhodobé propagace hESC-NPs *in vitro* objevuje trend exprese neuronálního vývojového znaku PSA-NCAM pozitivního na počátku (P1) s postupným poklesem v dalších pasážích, zatímco gliální prekurzorový znak A2B5 je na začátku nízký s naznačenou tendencí se s dalšími pasážemi zvyšovat, přičemž exprese obou znaků je u hESC-NPs nízká a málokdy přestoupí 50 % pozitivitu (obr. 28). Tyto nálezy mohou poskytnout další vysvětlení pro výše uváděné výsledky nižšího zisku neuronálních buněk z pasáže 8 a vyšší procento gliových buněk ve srovnání s prekurzory z P1. Panchision a kolegové (Panchision et al. 2007) našli po sortování myších neuroektodermálních prekurzorů z předního mozku na základě exprese CD133/CD15/CD24 *in vitro* buňky s neuronálním fenotypem (PSA-NCAM, MAP2, neuronální morfologie *in vitro*) v populaci CD24-pozitivních buněk bez ohledu na expresi ostatních dvou znaků, zatímco ostatní se formovaly do glia-like či tvořily populaci “silent” neurálních kmenových buněk.



Obr. 27: Rozšířený cytometrický panel pro hodnocení fenotypu neurálních buněk. hESC-NPs dle (Kozubenko et al. 2010) hiPS-NPCs dle (Romanyuk et al. 2014), SPC-01 (Amemori et al. 2013).

Charakterizace pomocí exprese povrchových glia- a neuronal-restricted markerů posouvají hiPS-NPCs na vyšší vývojový stupeň před hESC-NPs a dle tabulky charakterizující kmenové buňky a jednotlivé vývojové stupně neurálních buněk (tab. 5) navržené Pruszakem (Pruszak et al. 2007) zde prezentované *in vitro* derivované hESC-NPs nejlépe odpovídají vývojovému stupni NSC (neural stem cells) a hiPS-NPCs vývojovému stupni NP (neural precursors).



Obr. 28: Exprese lineage-specifických znaků A2B5 a PSA-NCAM u hESC-NPs během dlouhodobé propagace *in vitro*.

Ačkoliv hiPS-NPCs (a SPC-01) exprimují SSEA-1, CD24 i CD133, které představovaly rozdíl ve fenotypu hESC-NPs P5 (tumorigenních) a P8 (bezpečných), exprese těchto markerů na buňkách, které dosáhly vyššího vývojového stupně, nepředstavuje riziko maligního zvratu.

Za zmínku stojí vysoká exprese CXCR4/CD184 u hiPS-NPCs, ne však u hESC-NPs. Signalizace pomocí CXCR4/SDF-1 se v CNS uplatňuje při migraci, orientaci a pozici buněk a růstu axonů (Robin

et al. 2006). Schopnost reagovat na signalizaci SDF-1 může být jedním z dalších faktorů uplatňovaných při cíleném růstu axonů graftu do substantia nigra (Yang et al. 2013).

Cílený růst axonů a rekonstrukce poškozených drah je další otázkou významnou pro replacement therapy. Schopnost lidských neurálních prekursorů vytvářet axony v dospělém potkaním mozku po intrastriatální transplantaci byla představena Wictorinem (Wictorin et al. 1990). Transplantované neurální prekursor derivované z hiPS jsou schopné vytvářet funkční spoje s hostitelskými buňkami potvrzené imunohistochemicky i elektrofyziologicky (Ishibashi et al. 2004). Zda jsou takové spoje schopné vytvářet i transplantované neuronální buňky, zůstává zatím nejisté.

Sekundární degenerace mozkových struktur v okruzích spojených s primárně poškozenou oblastí je popsána u zvířat (Tamura et al. 1990; Freret et al. 2006; Lama et al. 2011). Redukce TH-pozitivních vláken ve striatu přímo koreluje s atrofií substantia nigra a produkce růstových faktorů ve striatu pomocí projikujících axonů do s. nigra chrání s. nigra před sekundární degenerací. Implantace mesenchymálních kmenových buněk do striata chrání s. nigra před toxickou lézí striata 6-hydroxydopaminem, což prokazuje možnou ochranu s. nigra vycházející ze striata (Blandini et al. 2010).

Naším významným výsledkem bylo zjištění, že transplantované hiPS-NPCs byly schopné projekce do vzdálených struktur, zde hostitelské s. nigra, s velkou specificitou. Tento nálezu ukazuje schopnost hiPS-NPCs rozpoznat cílové struktury na velkou vzdálenost. Molekulární podstata komunikace mezi implantovanými buňkami a cílovými strukturami není plně objasněná. Tento děj může být důsledkem celkových změn objevujících se v mozku po ischemickém infarktu (Moskowitz et al. 2010). Navíc jsme průkazem hostitelských TH-pozitivních vláken v blízkosti implantovaných buněk ukázali, že jde o reciproční děj. V modelu Parkinsonovy choroby s grafted derivovaných ES buněk do s. nigra se v projekci jejich axonů do striata se uplatňuje semaforinová produkce S3 ve striatu, kdy *in vitro* derivované embryonální buňky exprimují semaforinové receptory s odpovědí shodnou jako izolované TH-pozitivní mesencefalické prekursor a vykazují cílený růst axonů (Tamariz et al. 2010). Další uplatňovaným mechanismem může být potlačení apoptózy nigrálních neuronů pomocí produkce růstových faktorů tvořených transplantovanými buňkami, kde růstovými faktory stimulované antiapoptotické endogenní produkty (bcl-2) mohou sloužit jako chemoatraktant (Guo et al. 2012), přičemž nejjednodušším chemoatraktantem může být sám dopamin produkovaný v s. nigra a rozeznávaný D1 receptory na tvořících se axonech DARPP-32-pozitivních neuronů, přičemž aferentace z hostitelských struktur (dopaminergní projekce ze s. nigra, glutamátergí stimulace z kortexu) (Sun et al. 2012) mohou být významným činitelem terminální diferenciace v GABAergní projekční striatální neurony. Mikroprostředí, působení místa, kam byly buňky implantované, na směřování závěrečného vyžívání v místě příslušný typ buněk, je potvrzeno dále nálezy maturace hiPS-NPCs připravených pod stejným protokolem po implantaci do míchy: po čtyřech měsících po

transplantaci byly mezi implantovanými buňkami (MTCO2-pozitivními) potvrzeny motorické cholinergní neurony (pozitivní na AChE), dopaminergní neurony (TH-pozitivní), serotoninergní neurony (serotonin-pozitivní) a kalbindin-pozitivní neurony (Romanyuk et al. 2014).

V buněčné terapii, kde je terapeutickým podkladem obnovení funkce nahrazením ztracených buněk, by měl existovat časový vztah mezi návratem funkce a efektivním zapojením transplantovaných buněk. Podle našich zjištění signifikantní senzomotorické zlepšení u transplantovaných zvířat časově předcházelo průkazu zralých GABAergních neuronů s vytvořenými příslušnými spoji. Implantovaní potkani měli kratší latenci v testu s lepicí páskou již v době, kdy ještě nebyly GABAergní neurony a striatonigrální projekce prokazatelné, mezi zlepšením funkce a funkční projekcí uplynuly týdny. Tato časová diskrepance představuje možnost spolupůsobícího mechanismu, který není založen na zrání a přímé integraci transplantovaných hiPS-NPCs do hostitelské tkáně. Jednou z možností je humorální působení transplantovaných nezralých exogenních buněk, které uvolňují plejádu trofických faktorů spolupůsobících s vnitřními, hostitelskými mechanismy v procesu tkáňové regenerace (Yan et al. 2004; Pluchino et al. 2005; Borlongan a Hess 2006; Yasuhara et al. 2006; Hawryluk et al. 2012). Skutečně, podle našich dalších zjištění, transplantované hiPS-NPCs do modelu míšní léze zvyšují po transplantaci vlastní produkci NGF, FGF8 a GDNF a snižují produkci NT3, přičemž produkce potkaních růstových faktorů zůstává beze změny (Romanyuk et al. 2014). Po transplantaci neurálních prekursorů derivovaných z fetálních neurálních kmenových buněk (SPC-01) se objevuje vyšší produkce potkaních růstových faktorů NGF a NT3 a samotné buňky produkují BDNF a NGF (Amemori et al. 2013). Oba autoři také shodně dokladují předcházející se zlepšení senzomotorických funkcí proti funkční integraci a dozrávání implantovaných NPCs.

Na výsledky má v buněčné terapii vliv nejen typ buněk, ale i časování podání a optimální počet buněk. V případě neurálních prekursorů je optimálním terapeutickým oknem časná postischemická fáze, než dojde k rozvoji zánětlivé odpovědi (Darsalia et al. 2011). Proti různým typům neurálních a neuronálních prekursorů je humorální působení na postiženou tkáň v popředí zájmu a hlavní využívanou modalitou v případě terapie pomocí mesenchymálních kmenových buněk. Proti neurálním prekursorům jde o buňky s jednoduchým kultivačním protokolem a snadnou expanzní kapacitou. Ze známých vlastností se studuje jejich vliv na inhibici zánětu, inhibici buněčné smrti, extravazaci, stimulaci synaptické plasticity, endogenní neurogeneze (Onteniente 2013). Mechanismy ovlivnění zánětlivé odpovědi nejen v případě ischemického iktu, inhibice apoptózy či stimulace synaptické plasticity stojí v popředí zájmu v aplikaci mesenchymálních kmenových buněk, kdy k pozitivnímu účinku dochází i v případě podání buněk systémově, což je převládající způsob podání buněk v klinických testech (Onteniente a Polentes 2011) či nejsou v organismu nalezeny v čase, kdy přetrvává pozitivní efekt (Forostyak et al. 2014). Počet buněk podávaný v systémové imunosupresivní terapii

dosahuje řádu milionů na kg tělesné hmotnosti (Li et al. 2014), což vyžaduje optimalizaci kultivačního protokolu umožňujícího dosáhnout vysoký výtěžek v krátkém časovém intervalu.

Studovali jsme růstové vlastnosti a povrchové markery u lidských mesenchymálních stromálních buněk z kostní dřeně pěstovaných v různých médiích. Cílem studie bylo vyhodnotit různá média s ohledem na jejich možné užití v klinické praxi. Výběr séra ovlivňuje expanzi a vlastnosti buněk. Důležitý faktor je růst buněk s ohledem na hustotu vysetí. Neuhuber a kolegové se věnovali této otázce v experimentu s potkaními mesenchymálními buňkami a zjistili, že počáteční denzita výsevu ovlivňuje růstové charakteristiky kultury; za nejúspěšnější hustotu výsevu považuje 200 buněk/cm² (Neuhuber et al. 2008). Pro zhodnocení PD jsme vysévali buňky v denzitě 150 buněk/cm², která je přiměřená vzhledem k větším rozměrům lidských buněk proti potkaním. Nezávisle na denzitě vychází přídavek lidského séra od AB donorů jako nejlepší. Naše výsledky odpovídají těm prezentovaným v práci Stuteho a kolegů (Stute et al. 2004), který prezentoval zlepšenou růstovou kinetiku buněk expandovaných v autologním séru a srovnával je s užitým FBS. Nejlepších výsledků dosáhl použitím 10 % hABS. Přesto však 10 % koncentrace FBS dávala lepší výsledky než nízké (1 – 3 %) hABS, které potvrzují nutnost dostatečného množství séra k pokrytí buněčných potřeb. V našem pokusu 5 % koncentrace hCBS a hABS stále dávala velmi dobré výsledky ve srovnání s FBS. Čili se zdá, že minimální potřebná koncentrace séra pro zdárný růst buněk leží někde mezi 5 a 3 %.

V práci Shahdafara a jeho kolegů (Shahdadfar et al. 2005) se ovšem alogenní lidské sérum objevuje jako nevhodné, ve srovnání s autologním sérem a FBS. Shahdadfar a kolegové prezentují růstovou inhibici a krátké přežití kultury v allogenním hABS. Toto sérum, které použili, však bylo smíšené a pocházelo od různých dárců bez ohledu na jejich krevní skupiny. Je pravděpodobné, že růstová inhibice pozorovaná v allogenním smíšeném séru je způsobena obsahem aglutininů. Tento problém je překročen v prezentovaných pracích s užitým autologním sérem, protože sérum i buňky jsou té samé krevní skupiny. Pro naši domněnku svědčí i dobré výsledky dosažené v kultivaci buněk v hCBS. Toto sérum je vzhledem k získání omezeného množství také smíšené, avšak v séru novorozence nejsou aglutininy přítomny a objevují se až po několika měsících během života kojence.

V žádném z užitých lidských sér jsme nenalezli signifikantní rozdíl z žádném z hodnocených parametrů, který by šel na vrub použitému séru. 10 % FBS je momentálně nejvíce využívané sérum pro výzkumné účely a také pro pilotní studie ve veterinární medicíně při zavádění buněčné terapie u zvířat (Penha et al. 2014). Různé šarže FBS však mohou mít odlišné vlastnosti a ovlivňovat tak růst a fenotyp pěstovaných buněk. V této studii jsme použili FBS standard a gold quality od PAA Laboratories (Linz, Austria) a certifikované sérum od Gibco, ale nenašli jsme rozdíl ve vlastnostech buněk pěstovaných v těchto sérech. Zdá se pravděpodobné, že lepší výsledky budou dosaženy v médiích obohacených séry ze speciální produkce, určené a testované pro kultivaci a expanzi MSC (Lonza).

Studie zaměřená na kinetiku růstu odhalila, že čas potřebný pro zdvojení populace byl téměř dvojnásobný u buněk kultivovaných v médiích s FBS. Přesto však analýza buněčného cyklu neodhalila žádné rozdíly v proporcích buněk v jednotlivých fázích cyklu. Rozdíly mezi jednotlivými médii stírala velká variabilita uvnitř jednotlivých skupin. Obecně ve všech médiích byla většina buněk nalezena ve fázi G1/G0 (více jak 90 %), pouze malá část proliferovala. Zdá se tedy, že kratší doba zdvojení objevená v médiích s přidavkem lidských sér a MSCGM a vyšší přírůstky jsou způsobeny rychlejším dělením buněk, než vyšší proporcí buněk vstupujících do cyklu. Variabilita nalezená v rámci jednotlivých médií je spíše zapříčiněna jinými faktory, jako je celková délka kultivace, doba od vysetí ke sklizení buněk na analýzu cyklu či denzita buněk v kultivační nádobě, než samotné použité sérum. Naše zjištění ohledně buněčného cyklu se nevymyká nálezům Congeta a Minguella, kteří podobně jako my našli pouze 10 % dělících se buněk, avšak i tato proporcčně malá skupina byla schopna udržet dostatečný růst kultury (Conget a Minguell 1999). Při stejné počáteční denzitě vysévání jsme byli schopni získat během tří týdnů kultivace 6 – 10x více buněk pro FACS analýzu, případně získat dostatečné množství buněk již po dvou týdnech v médiích s lidskými séry (a v MSCGM), ve srovnání s průměrně čtyřmi týdny růstu nutných v médiích s FBS.

MSC získané z kostní dřeně lze kultivovat v různých médiích bez významné změny fenotypu. Bohužel neexistuje jeden marker, který by nade vše pochybnost uměl detekovat MSC ve směsi buněk a to zejména *in vivo*. Pittenger a kolegové (Pittenger et al. 1999) definovali MSC jako pozitivní na markery CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD29, CD71, CD90, CD106, CD120a a CD124, přičemž negativní jsou CD34, CD45, CD14. Pro účely sjednocení vydala ISCT v roce 2006 kritéria pro definování MSC (Kassem et al. 2004). Podle těchto kritérií se za mesenchymální stromální buňky považují buňky pozitivní na CD73, CD90, CD105 a negativní na CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19 nebo CD79α a HLA-II. Tato kritéria platí pro MSC získaná ze všech zdrojů. Definovali jsme naše kultivovaná MSC podle těchto doporučených kritérií, kdy jsme zařadili trojici pozitivních znaků CD73, CD90 a CD105 a negativní znaky CD34 a CD45 jako nezbytné v každém protokolu pro hodnocení MSC. Z pilotního experimentu jsme vyřadili CD11a a CD19 vzhledem k většímu zájmu o pozitivní znaky, než o negativní. CD19 a CD11b nejsou nezbytné v panelu vzhledem k faktu, že nepřítomnost CD45 znaku vylučuje přítomnost formovaných zralých jaderných krevních elementů a ověřovat přítomnost zralých B-lymfocytů (CD19+) je v tomto případě redundantní. Přítomnost nezralých lymfocytů (CD10- pozitivních) a dalších hematopoetických elementů, je potvrzena negativitou populace na CD34. Kultivované MSC byly pozitivní na CD73, CD90 a CD105 a negativní na CD34, CD45 a CD235a (glykoforin-A, marker erytrocytů a jejich vývojových stadií). Podle požadovaných kritérií (Pittenger et al. 1999; Dominici et al. 2006) byly kultivované buňky negativní na CD271 (NGFR neboli p75), zatímco tento zajímavý marker zásadní pro neurální kmenové buňky a neurální prekursor je pozitivní u buněk *in vivo* a užívá se pro prospektivní izolaci MSC (Bühring et al. 2007, 2009; Battula et al. 2009).

Expresce dalších zkoumaných markerů, patřících mezi integriny a adhezní molekuly, byly exprimovány pouze na buňkách pěstovaných v médiích s lidskými séry. CD29/beta-1-integrin, patří k markerům vysoce exprimovaným na MSC pěstovaných v lidských médiích, se objevuje i na v první části prezentovaných *in vitro* derivovaných neurálních prekuzorech (shodně s vysokou expresí na hESC-NPs i na hiPS-NPCs). Integriny hrají zásadní roli v buněčné morfologii, adhezi a migraci. CD29-deficitní buňky proliferují a mají normální délku života v kultuře, avšak ztrácejí přirozenou polaritu, tvoří abnormální výběžky nebo jsou změněného tvaru. CD29^{-/-} myši při narození vykazují těžké malformace mozku a umírají předčasně. Jejich Schwannovy buňky nejsou schopny vysílat výběžky a vytvářet funkční myelinové pochvy, ačkoliv tvorba myelinu je normální (Graus-Porta et al. 2001; Feltri et al. 2002). Buňky v FBS-obohacených médiích, na kterých byla nalezena nízká exprese CD29, neměly typický vřetenovitý tvar jako MSC kultivované v lidských sérech, ale byly spíše plachtovité a s krátkými redukovanými výběžky.

CD44 je adhezní marker ke kyselině hyaluronové, jako složce mezibuněčné matrix. Myši knockouti pro CD44 mají normální neurologický vývoj, avšak vykazují hematologické změny s narušenou distribucí myeloidních progenitorů, Schmits (Schmits et al. 1997) prezentuje nález myeloidních buněk s narušenou schopností uvolňovat se z kostní dřeně. CD44^{-/-} osteoklasty vykazují zesílenou odpověď na TNF α , jednoho z hlavních induktorů zánětu. Hayer (Hayer et al. 2005) představuje CD44 jako klíčový inhibitor TNF indukované kostní a kloubní destrukce. U pacientů s kritickou končetinovou ischemií léčenými autologními mononukleárními buňkami a s dobrou odpovědí na léčbu byla na jejich MSC v kostní dřeni nalezena vyšší exprese CD44 než u non-respondentů (Altaner et al. 2013). CD44 je také receptorem pro osteopontin (Weber et al. 1996) a podílí se na migraci neurálních endogenních prekuzorů ze subventrikulární zóny do místa léze, kdy je třeba součinnosti CD44 a CD29 na aktivovaných endogenních prekuzorech (Yan et al. 2009).

Další integrinové receptory CD61/51 a CD49a, nebyly exprimovány na MSC kultivovaných v sérech obohacených FBS a nízká nebo střední exprese byla pozorována jen na buňkách z lidských médií. Expresce CD61/51 a CD49a souvisí s expresí dalších receptorů integrinové rodiny (CD29) a adhezních markerů (CD44). Integriny jsou klíčovými strukturami zprostředkovávajícími informace z mezibuněčné matrix buňkám (matrix-to-cell interaction) a recipročně od buněk k matrix (cell-to-matrix).

CD71 je transferinový receptor a v případě jeho exprese není nijak překvapivé, že se zvyšuje u buněk z médií s vyšší proliferací kapacitou a tedy vyšší metabolickou potřebou železa.

V několika vzorcích kultivovaných v MSCGM se objevila exprese MHC-II. Lidské MSC nejsou profesionálními antigen prezentujícími buňkami (APC), jako většina jaderných buněk však umí vystavit tyto molekuly po určitém stimulu. K těmto stimulům patří expozice IFN γ a TGF β (Romieu-

Mourez et al. 2007). Nevíme, zda expozici MHC-II způsobila nějaká příměs ve složkách MSCGM, tytéž buňky od stejného dárce pěstované v dalších médiích MHC-II neexprimovaly. Tak jako tak, exprese MHC-II svědčí nežádoucí expozici zánětlivým molekulám, což může napovědět jako indikátor v procesu kontroly kvality ve výrobě.

Konečně další kritérium stanovené ISCT pro definování MSC je jejich schopnost osteogenní, chondrogenní a adipogenní diferenciaci. Naše výsledky ukazují, že tato diferenciací kapacita nebyla narušena kultivací z žádném z testovaných médií. Osteogenní diferenciaci byla nejrychlejší v hCBS, následována hABS, což potvrzuje předchozí nálezy Junga a kol. (Jung et al. 2009) a Tekkatty (Tekkatt et al. 2012) o vyšším osteogenním potenciálu pupečnickového séra.

Pokud shrneme naše nálezy o využití lidských derivátů pro klinické užití, hABS poskytuje velmi podobné výsledky jako hCBS, který však představuje mnohem omezenější zdroj v relacích potřebných pro vypěstování dostatečného množství buněk pro klinické užití. Použití hABS je podřízeno stejným pravidlům jako užití jiných krevních derivátů, s cílem zamezit přenosu krví a jejími deriváty přenosných infekcí, jako je HIV a HVB. MSCGM bylo sice vytvořeno přímo s cílem expanze MSC a v našem pokusu bylo docíleno velmi dobrých výsledků, avšak je schváleno pouze pro výzkumné užití a případný problém pro klinické užití by představovalo složení jednotlivých komponent, které je firemním tajemstvím a není veřejně známo. Sice existují klinické studie, kde ve fázi I. bylo pro expanzi buněk využito FBS (Mazzini et al. 2010), přesto se FBS neukazuje jako vhodné z hlediska pomalé expanze a nízké výtečnosti i po prolongované kultivaci a z hlediska downregulace markerů, které mají zásadní význam pro uplatnění buněk a jejich funkcí po transplantaci.

V současné době se jako nejvhodnější suplement pro expanzi MSC v klinické praxi nabízí destičkový lyzát (hPL). Přípravek lidského původu překračuje nevýhody zvířecího séra a snižuje zátěž dárců při odběru séra versus destiček na hematologických separátorech. Užití destičkového lyzátu je ve shodě s GMP požadavky (Sensebé et al. 2011; Fekete et al. 2012) (Sensebé et al. 2011). Destičkový lyzát obsahuje růstové faktory bFGF, destičkové růstové faktory (PDGF-AA, PDGF-AB/BB), solubilní CD40L (sCD40L), vaskulární adhezní molekulu-1 (VCAM-1), mezibuněčnou adhezní molekulu-1 (ICAM-1), chemokinový (C-C) ligand 5 (CCL5; RANTES), TGF- β 1 (Fekete et al. 2012), IGF-1, VEGF, kdy PL růstové faktory obsahuje ve větším množství než FBS, stejně jako proteiny a lipidy, naopak PL má menší množství alkalické fosfatázy, kreatininu a LDH. Zisk buněk po týdenní kultivaci dosahuje při nahrazení FBS PL až čtyřnásobku (Shanskii et al. 2013). Optimální výsledky jsou dosaženy při 5 % přídavku PL, ve srovnání s 10 % FBS (Capelli et al. 2007). Fenotyp buněk a jejich diferenciací kapacita nejsou v PL dotčeny (Mojica-Henshaw et al. 2013). Buňky pěstované v hPL vykazují kratší dobu PD a významně brání senescenci buněk, čímž prodlužují dobu kultivovatelnosti buněk (Griffiths et al. 2013). Výrobci LP moderní terapie realizují výrobu přípravků somatobuněčné terapie v hPL (BioInova s. r. o., <http://bioinova.avcr.cz/index.html>).

Růst a proliferační kapacita buněk nemá jen klinický a výzkumný význam pro získání velkého množství buněk potřebných pro terapeutický účinek *in vivo*. Buněčný typ, kde se liší molekulární výbava buňky, její transportní systémy, adhezní molekuly, produkce mezibuněčné matrix, rychlost růstu, jsou všechno determinanty uplatňující se v řešení otázky intracelulárního značení pomocí jednoduchých magnetických, ale zejména vícemodálních složitých nanočástic. V naší práci věnované intracelulárnímu značení buněk jsme zjistili, že se komerční přípravek Endorem® ukázal jako s nejlépejšími značicími vlastnostmi (40 – 60 %) ve srovnání s ostatními nanočásticemi, zatímco částice PLL- γ -Fe₂O₃ a manóza- γ -Fe₂O₃ byly internalizovány do buněk s nejvyšší účinností. Příjem nanočástic do buněk je primárně ovlivněn jejich velikostí a chemickým složením povrchu (Jo et al. 2010). Manózové nanočástice jsou internalizovány mechanismem mannózového transportu, který je přítomen na membráně savčích buněk (Panneerselvam a Freeze 1996). PLL- γ -Fe₂O₃ částice jsou vnášeny do buněk díky odlišnému náboji PLL a membrány. Podobně jako Endorem®, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ jsou inkorporovány do buněk pomocí endocytózy. Větší příjem PDMAAm- γ -Fe₂O₃ než Endoremu® může být asociován s jejich pozitivním povrchovým nábojem, kterým jsou přitahovány k negativně nabitým buněčným membránám a s jejich menší velikostí ve srovnání s Endoremem® (Horák et al. 2009). Velikost tedy pravděpodobně hraje roli v lepším příjmu Endoremu® v suspenzi s PLL, než u Endoremu® obaleném PLL. Velikost samotného Endoremu® je kolem 130 nm, potah PLL téměř zdvojnásobí jejich velikost (145 – 260 nm).

Velikost částice a její složení není jediným kritériem, které rozhoduje o úspěšnosti značení buňky. Tato úspěšnost se lišila v případě totožného typu buněk od různých dárců. Například úspěšnost značení u vzorku hBMSC-1 byla v případě PLL- γ -Fe₂O₃ 92 %, u PDMAAm- γ -Fe₂O₃ 80 % a u Endoremu® 38 %, zatímco u dárce hBMSC-2 byla 83 %, 66 % a 58 %. Je znám fakt, že příjem SPIONs je velmi variabilní mezi různými buněčnými druhy (Ketkar-Atre et al. 2013). Rozdíly jsou pozorované mezi potkaními a lidskými mesenchymálními stromálními buňkami různých pasáží (Horák et al. 2009). Pro hodnocení příjmu nanočástic mesenchymálními stromálními buňkami zde jsme využili buňky ze třetí pasáže k minimalizaci rozdílů způsobených rozdílnou dobou kultivace buněk.

Buňky značené nanočásticemi s navázanou fluorescenční látkou jsou přístupné hodnocení příjmu nanočástic pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda představuje rychlejší a kapacitnější způsob analýzy proti náročnému počítání efektivitu značení nefluorescenčními částicemi v kultuře, kdy můžeme získat velmi komplexní informace o procentu označených buněk a střední hodnotě množství přijatých nanočástic, v kombinaci s dalšími testy (apoptóza, viabilita, detekce volných radikálů) (Yang et al. 2011). S užitím definovaných standardů by byl možný i výpočet množství přijatého železa, avšak výtěžnost metody limituje vymývání fluoroforu pozorované postupem času. Značení nanočástic fluorescenční značkou vyžaduje pro úspěšnost vazby fluoroforu několikakrokovou proceduru. Obal

částic pomocí siliky a chitosanu má protektivní účinky před zhášením fluoresceinu působením maghemitového jádra, ale navíc stabilizuje částici v koloidu. Částice s vícesložkovým obalem FITC- γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS byly nejlépe přijaté mesenchymálními buňkami (66 %), zatímco částice s jednoduchým obalem z chitosanu vyšly v testu nejhůře, podobně jako komerční Endorem® (kolem 40 % ve všech testech). Biodegradabilní chitosan se v této podobě bez komplexní vazby na siliku může snadno uvolňovat, což zhoršuje biologickou dostupnost částice. I nejúspěšnější částice γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS byly inkorporované s menší úspěšností než PLL- γ -Fe₂O₃ a jejich uptake odpovídá PDMAAm- γ -Fe₂O₃. Chitosan je kationický polymer podobně jako PLL (Vavříková a Vinšová 2008), avšak menší příjem než PLL- γ -Fe₂O₃ může jít na vrub velikosti polykompozitních částic γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS.

Odpověď buněk na uptake nanočástic se zdá být závislá na dárci. Například odpověď hBMSC na stimulaci LPS a produkce cytokinů byla odlišná mezi buňkami pocházejícími od různých dárců (Montzka et al. 2010). V našem případě byly rozdíly pozorovány v případě buněk hBMSC1 a hBMSC2, kdy kultura hBMSC1 vykazovala silný, avšak přechodný pokles viability analyzovaný pomocí WST-1 testu, stejně jako nedošlo k rozdílům v buněčné smrti buněk značených různými SPIONs ani v jednom intervalu. Naproti tomu viabilita hBMSC2 byla snížena všemi testovanými nanočásticemi s výjimkou PLL-Endorem® a PDMAAm- γ -Fe₂O₃ a tento efekt byl ještě více zvýrazněn v intervalu 2, po odmytí SPIONs a nahrazení média čistým. Po modelu situace, kdy by všechny buňky byly značeny 100 %, se všechny testované SPIONs jeví jako cytotoxické a podíl mrtvých buněk se lišil pro jednotlivé nanočástice. Z tohoto výsledku vyplývá, že toxicita SPIONs je, mimo jiné, závislá na úspěšnosti značení. Tato toxicita nebyla u hBMSC1 snížena ani po odmytí částic ve druhém intervalu, naopak u některých částic (Endorem®) došlo naopak ke zhoršení. Pouze PLL-Endorem® se zdá být jistou výjimkou, tento efekt je patrně způsoben tím, že nanočástice PLL-Endorem® má dvojí obal a díky tomu dochází k uvolňování toxického železa z magnetického jádra s určitou prodlevou.

Pokles viability není následován úrovní buněčné smrti ve stejné proporcii. Například nejtoxičtější SPION, neobalený maghemit, snižuje viabilitu na 50 %, ovšem usmrcuje pouze 17 % buněk. Z toho vychází, že snížení viability částicemi nemusí vést ke smrti buněk, stejně tak buněčná smrt sama nezpůsobuje pokles viability kultury. Podíl proliferujících buněk kultur hBMSC je nízký, z předchozích testů víme, že pouze cca 10 % buněk vstupuje do buněčného cyklu a viabilita kultur může být potlačena snížením proliferační kapacity hBMSC2. Ačkoliv jsme nenalezli v předchozím testování žádnou korelaci mezi PD, buněčným cyklem a věkem nebo pohlavím dárce a i jiné reporty dokládají věkem nezměněný počet buněk, jejich viabilitu a proliferaci, přesto je známo, že věkem dochází ke zhoršení diferenciační kapacity a snížené odolnosti proti oxidačnímu stresu (De Barros et al. 2013), kdy byly potvrzeny snížené exprese enzymů sloužících jako vychytávače ROS (Duscher et al. 2014).

Vzhledem k rozdílnému stáří obou donorů (40 let) může být věk jednou z determinant, která se ve výsledku může významně promítnout.

Oxidační stres, způsobený produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), nemusí být bezprostřední příčinou smrti buněk, ale jeho účinky jsou kumulativní a dlouhodobé. Obě kultury, hBMSC1 i hBMSC2, ačkoliv první z nich poměrně rezistentní k toxickým účinkům ROS, vykazaly signifikantní vzestup oxidativního poškození makromolekul a v tomto případě se neobjevilo ani zlepšení během následné kultivace v čistém médiu. Tento jev byl zjevný zejména v případě peroxidace lipidů, jejichž marker – 15-F_{2t}-isoP – překročil několikrát koncentraci nalezenou v kontrolních neznačených buňkách a dále se ještě zvýšil během následného intervalu 2. Tento jev může být způsoben dalším pokračujícím vývojem ROS na inkorporovaných částicích a také nedostatkem rychlých reparačních mechanismů umožňujících opravy poškozených lipidů. Buňky mohou také velmi rychle augmentovat své interní mechanismy v obraně proti ROS (zvýšení aktivity superoxiddismutázy, katalázy, glutathionperoxidázy, glutathiontransferázy a glutathionreduktázy) (Radu et al. 2010). V případě poškození DNA se uplatňují rychlé mechanismy umožňující odstranit poškozené báze, což je v případě potřeby taktéž kapacitně navýšeno (Risom et al. 2003). Pro navýšení reparačních mechanismů svědčí též naše další nálezy během testování nových kompozitních nanočástic Co_{0,5}Zn_{0,5}Fe₂O_{4+γ} (CZF) + silica, kdy bylo oxidativní poškození makromolekul nalezeno teprve u pětinasobné koncentrace nanočástic, avšak detekce volných radikálů provedena ve stejném čase nenalezla žádný vzestup ROS proti neznačeným kontrolám a proti buňkám inkubovaným se stejnou koncentrací CZF jako γ-Fe₂O₃ SPIONs (Novotná et al. 2015). Podobně Yang a kolegové nenalezli přítomné ROS po prolongované inkubaci lidských mesenchymálních buněk s ferukarbotranem (Resovistem®) (Yang et al. 2011) ani Chen po inkubaci Endoremu® s potkaními NPCs (Chen et al. 2013). Tyto nálezy by svědčily pro vývoj ROS krátce po přidání nanočástic s poškozením makromolekul (pod hranicí navození buněčné smrti) s následnou rychlou aktivací intracelulárních mechanismů vychytávajících ROS, které tak po nejširěji užívané době inkubace (24 – 48 h) už nejsou detekovatelné. V případě γ-Fe₂O₃ SPIONs byl potvrzen genotoxický efekt u všech nanočástic, ačkoliv jeho míra byla variabilní. Nejslibnější výsledek vykázal komplex Endorem® s PLL, ovšem vzhledem k vysoké peroxidaci lipidů a proteinů je patrně nízká genotoxicita dočasným jevem. PLL-γ-Fe₂O₃ v obou vzorkách vykázal vysoký počet zlomů DNA, ale nezvýšil se počet specifických míst pro enzymatické štěpení pomocí FPG a ENDO III. Kapacita buněk značených PLL-γ-Fe₂O₃ pro opravy DNA byla dostatečná pro rychlé vystřížení oxidovaných bazí, kde se pak vytvářely snadněji dvou- i jednořetězcové zlomy DNA.

Přestože SPIONs jsou schopny značit i neurální prekursorů bez známek poškození nebo narušení buněčné diferenciaci a přežívání *in vivo* (Amemori et al. 2013; Chen et al. 2013), vystavení buněk vlivu γ-Fe₂O₃ působí dlouhodobý oxidativní intracelulární buněčný stres. Ačkoliv jsou důkazy pro

bezpečnost implantace značenými buňkami (Guzman et al. 2007), přesto se může po implantaci takových buněk objevit zánětlivá reakce vyvolaná produkcí volných radikálů (Hanini et al. 2011) po uvolnění částic do okolí po rozpadu buněk nebo expulzi nanočástic během buněčné diferenciaci (Amemori et al. 2013). Oxidativní poškození indukované nanočásticemi nevede přímo, jak ukázáno, ke smrti buněk, ale může z dlouhodobého hlediska ovlivnit funkce implantovaných buněk a okolí narušením buněčné adheze, migrace a morfologie (Catalá 2009). Navzdory nálezu oxidativního poškození makromolekul jsou hBMSC značené SPIONs schopny zlepšit neurologický deficit experimentálních zvířat po lézi (Jendelová et al. 2003; Urdžíková et al. 2006), kdy regenerativní účinek implantovaných MSC založený na produkci cytokinů a růstových faktorů není narušen (van Buul et al. 2011). Na druhou stranu, Endorem® podaný *in vitro* k mesenchymálním stromálním buňkám inhiboval chondrogenní diferenciaci, zatímco adipogenní a osteogenní diferenciaci proběhla bez problému. Po snížení dávky přidaného Endoremu® na polovinu se proces chondrogenní diferenciaci alespoň zčásti obnovil (Kostura et al. 2004). Jiné zprávy, popisující značení buněk pomocí Resovistu, popisují chondrogenní diferenciaci jako nenarušenou (Yang et al. 2011) nebo s menším množstvím produkovaných glykosaminoglykanů (Boddington et al. 2011), přičemž množství přijatého Resovistu bylo závislé na délce inkubace a s ní negativně korelovala produkce GAG (Henning et al. 2009). Podle předchozích zjištění (Babic et al. 2008; Horák et al. 2009), obsah nanočástic v jedné buňce se v závislosti na obalu pohyboval od 14,6 – 51,7 pg Fe na jednu buňku, obsah železa u částic CZF při 15 µg Fe/ml média byl 17 – 27 pg Fe (Novotna et al. 2015). Toto množství bylo srovnatelné s experimentem Kosturové (Kostura et al. 2004), kde obsah železa v buňkách byl 13 – 16 pg Fe/ml. Mesenchymální stromální buňky (Novotna et al. 2015) ani hiPS-NPCs značené CZF částicemi nevykazují narušenou diferenciaci, stejně jako SPC-01 značené PLL-γ-Fe₂O₃, kde však víme, že efektivita značení proti mesenchymálním buňkám je poměrně nízká (dosahuje 57 %), avšak i tato úroveň značení postačuje, aby byly značené implantované buňky velmi dobře viditelné pomocí MRI (Amemori et al. 2013). Potkaní neurální progenitory ze SVZ byly značeny různou koncentrací Endoremu® po různou dobu, přičemž jako nejefektivnější byla vyhodnocena koncentrace 75 µg Fe/ml se 48h inkubací, která vyústila v obsah 5,3 pg Fe/buňka a dobrou viditelností takto značeného transplantátu *in vivo* (Chen et al. 2013). Podle Heyna je hraniční koncentrací pro viditelnost značené buněčné suspenze 1,4 – 3 pg Fe na buňku (Heyn et al. 2005). Práce s Resovistem se pohybovaly v řadě od 1 µg do 100 µg Fe/ml média, kdy depozita nanočástic byla viditelná ve všech buňkách (100 % efektivita), ale v různém množství (hodnoceno pouze opticky na základě intenzity rezavého zbarvení pelety) (Yang et al. 2011), Kosturová přidávala 25 µg Fe/ml média s 24h inkubací (Kostura et al. 2004). Na základě našich výsledků se zdá, že 15 µg Fe/ml, čemuž odpovídá rozmezí cca 15 – 50 pg Fe v buňce, je dostatečné pro zachování zobrazovacího potenciálu, ale také hraniční pro riziko oxidativního poškození makromolekul, přičemž pro efektivní užití SPIONs jako MRI kontrastu stačí mnohem menší množství přijatého intracelulárního železa.

7. Zhodnocení cílů a hypotéz

- 1) Úspěšně jsme provedli *in vitro* diferenciaci lidských pluripotentních kmenových buněk odlišného původu, lidských embryonálních kmenových buněk linie CCTL14 a lidských indukovaných pluripotentních buněk pocházejících z linie lidských fetálních fibroblastů iMR90, do neurálního a neuronálního fenotypu potvrzeného imunohistochemicky a průtokovou cytometrií.
- 2) Použitý diferenciační protokol a délka kultivace vede k odlišné výsledné vývojové úrovni takto získaných neurálních prekursorů, kdy duální inhibice BMP/TGF-beta resultuje ve vyšší vývojovou úroveň charakterizovanou expresí specifických neuronálních/gliálních prekursorů, které jsou během čtyř měsíců schopny vyzrávat v místně-specifické striatální neurony a projikovat do cílových struktur.
- 3) Behaviorální testy potvrdily zlepšení se neurologických funkcí časově předcházející před nálezem novotvořených transplantovaných neuronů maturovaných na potřebnou funkční úroveň. Tyto výsledky potvrzují humorální vliv transplantovaných prekursorů na hostitelskou tkáň a její regenerativní procesy.
- 4) Lidské mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně jsou schopny adheze a proliferace v allogením lidském séru od donorů krevní skupiny AB, podobně jako v lidském pupečnickovém séru. Buňky pěstované v hABS či hCBS exprimují povrchové znaky charakteristické pro mesenchymální kmenové buňky a jsou schopny diferenciaci do tří linií (osteo-, adipo- a chondrodiferenciaci) podle požadavků ISCT. Tato lidská séra jsou tak možnou alternativou pro růst a expanzi v klinické praxi a nahrazení používaného FBS.
- 5) Kontrastní látky založené na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ jsou přijímané lidskými mesenchymálními kmenovými buňkami v závislosti na svém biokompatibilním obalu, přičemž tyto značené buňky mají zachovalou viabilitu a nízkou úroveň buněčné smrti, avšak nezávisle na použitém materiálu obalu tyto nanočástice přesto svým uvolňováním volných reaktivních radikálů působí oxidativní poškození makromolekul, které by mohlo působit chronické poškození buňky a okolních tkání.
- 6) Příprava bimodální kontrastní látky FITC- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -(silika) je umožněna dalšími chemickými modifikacemi povrchu se zvýšením vazebných míst, takto značené buňky jsou na základě fluorescence detekovatelné jak *in vitro*, tak *in vivo* ve stejné lokalizaci, kde je značený transplantát potvrzený pomocí MRI.

8. Souhrn

Naše výsledky potvrzují, že pluripotentní buňky je možno úspěšně diferencovat směrem k transplantabilním neurálním a neuronálním prekursorům a to jak embryonální kmenové buňky, tak indukované pluripotentní buňky. Tyto buňky derivované pod dvoukrokovými protokoly potvrzují schopnost kopírování vývoje neuroektodermové vývojové řady charakterizované expresí markerů, které jsou obdobně popsány z vývoje neurální tkáně *in vivo*. Na základě těchto markerů jsme charakterizovali takto *in vitro* vznikající neurální prekuzory a progenitory a definovali vhodný profil neurálních prekuzorů bezpečný pro transplantaci. Popsali jsme dvojí efekt těchto transplantovaných buněk na zlepšení ztracených neurologických funkcí experimentálního zvířete – jedním efektem je časné nastupující a dočasný parakrinní efekt transplantovaných buněk, druhým efektem je zapojení transplantovaných buněk, které je založeno na cíleném prorůstání vláken do cílových struktur a na vytvoření funkčních synapsí v hostitelském mozku, což vyžaduje delší čas a je trvalého charakteru.

Mesenchymální kmenové buňky lze s úspěchem pěstovat i v xeno-free mediu požadovaném pro klinické využití, buňky zachovávají své vlastnosti (fenotyp, schopnost diferenciace) a navíc pěstováním v médiu s lidskými séry získáme vyšší výtěžek v kratším čase, než v médiu obohaceném fetálním hovězím sérem, které se běžně užívá v experimentu. Budoucí vývoj naznačuje nahrazení i těchto sér dalšími produkty lidského, xeno-free původu, které jsou ekonomicky dostupnější než rekombinantní růstové faktory, jako je v současné době ve výrobní praxi upřednostňovaný lidský destičkový lyzát.

Konečná koncentrace železa v buňce by měla být dostatečná pro potřeby MRI jako kontrastní látky, ovšem natolik nízká, aby nedocházelo k oxidačnímu poškození DNA, lipidů a proteinů. Příjem nanočástic buňkou, jak vyplývá z výše předkládaného souhrnu, je vícemodální záležitost a modifikace obalů částic je pouze jednou z možných cest ve vývoji nových kontrastů pro MRI. Titrace koncentrace částic pro inkubaci a délka inkubace musí být provedena s ohledem na lišící se kapacitu jednotlivých buněčných typů přijímat nanočástice, které je možno ovlivnit přidavkem transfekčního činidla, což je ovšem realizovatelné během pokusů *in vitro*, ne *in vivo*. Další vývoj směřuje k produkci takových nanočástic, kde bude možný příjem významně většího množství nanočástic bez následného poškození buněk či celého organismu. Tento trend může jít směrem k optimalizaci povrchových modifikací společně s ohledem k víceúčelovému využití takových nanočástic, druhý směr spíše půjde směrem k nanočásticím se zcela odlišným složením, které samo o sobě může zcela změnit vlastnosti a biokompatibilitu částice bez dalších nutných modifikací povrchu.

9. Summary

Our results showed that human pluripotent cells are able to differentiate towards transplantable neural and neuronal precursors. This capability was verified for both embryonal and induced pluripotent cells. Our cells can follow the neuroectodermal development described in brain and spinal cord tissue during ontogenesis, which is characterized by the expression of different surface and cytoplasmic markers appearing on distinct levels of neurogenesis. Based on this expression, we defined our pluripotent cell-derived neural precursors as neural stem cells and neural progenitors and defined the most suitable developmental level for neural transplantation. We found a double effect of these transplants in restoring neurological functions; firstly, the neural transplants have a paracrine effect on damaged tissue, which is rapid and transient and, secondly, they have an effect on the functional and structural integration of exogenous cells in host brains, including the axonal targeting of specific structures. This second effect is permanent.

Mesenchymal stem cells were successfully cultivated in a xeno-free media required for GMP. Widely used foetal bovine serum was replaced with human adult and neonatal sera, in which the cells maintain the same phenotype and differentiation capacity. Moreover, the cells yielded in higher numbers than in standard bovine foetal serum supplemented media. For the future, our research suggests the complete replacement of animal sera with human source supplements like human platelet lysate, which is affordable and easy to obtain.

The final concentration of ferrumoxide nanoparticles in the cell should be sufficient for MRI *in vivo* imaging with avoiding oxidative damage of DNA, lipids and proteins. The nanoparticle uptake is multimodal. The nanoparticle coat modification presents one of many ways of which to influence labeling potential. The labeling period and nanoparticle concentration in cultivation media needs to be titrated with respect to the different cell types. We found that a transfection agent improved the nanoparticle uptake, although this procedure would not be suitable for use *in vivo*. The future trends in nanomaterial research consist of new coating materials and technologies in multimodal nanoparticles or, more likely, the design of new magnetic cores with low toxicity, fine contrast properties and without the necessity of consecutive surface modification.

10. Publikace autorky

Publikace, které jsou podkladem práce:

Kozubenko N., **Turnovcova K.**, Kapcalova M., Butenko O., Anderova M., Rusnakova V., Kubista M., Hampl A., Jendelova P., Sykova E.: Analysis of *in vitro* and *in vivo* characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. Cell Transplant. 2010;19(4):471-86. Epub 2009 Dec 18. IF 3.57

Podíl autorky: 30 % (zvířecí model, transplantace, FACS)

Polentes J., Jendelova P., Cailleret M., Braun H., Romanyuk N., Tropel P., Brenot M., Itier V., Seminatore C., Baldauf K., **Turnovcova K.**, Jirak D., Teletin M., Côme J., Tournois J., Reymann K., Sykova E., Viville S. and Onteniente B.: Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. Cell Transplant. 2012 Aug 10. IF 3.57

Podíl autorky: 25 % (zvířecí model transplantace, FACS, behaviorální testy)

Turnovcova K., Ruzickova K., Vanecek V., Sykova E., Jendelova P.: Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. Cytotherapy. 2009;11(7):874-85. IF 3.100

Podíl autorky: 50 % (FACS, analýza dat, příprava publikace)

Novotna B., Jendelova P., Kapcalova M., Rossner P., **Turnovcova K.**, Bagryantseva Y., Babic M., Horak D. and Sykova E.: Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles. Toxicol Lett. 2012 Jan 16;210(1):53-63, IF 3.355

Podíl autorky: 40 % (FACS, kultivace a značení, viabilita)

Chekina N., Horak D., Jendelova P., Trchova M., Benes J. M., Hruby M., Herynek V., **Turnovcova K.** and Sykova E.: Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. J. Mater. Chem., 2011, 21, 7630. IF 6.626

Podíl autorky: 15 % (kultivace a značení, transplantace, histologie)

Další publikace autorky:

Novotna B., **Turnovcova K.**, Veverka M., Rössner P., Bagryantseva Y., Herynek V., Zvatora P., Sykova E., Jendelova P.: Biological effects of silica encapsulated CZF (cobalt zinc ferrite) nanoparticles in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Nanotoxicology* in submission 2015

Kočí Z., **Turnovcová K.**, Dubský M., Baranovičová L., Holář V., Chudíčková M., Syková E., Kubinová S.: Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic patient's distal limbs with critical ischemia. *Cell Biochem Funct.* 2014 Sep 23. IF 2.134

Romanyuk N., Amemori T., **Turnovcova K.**, Prochazka P., Onteniente B., Sykova E., Jendelova P.: Beneficial effect of human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair. *Cell Transplant.*, accepted 08/14/2014, IF 3.570

Forostyak S., Homola A., **Turnovcova K.**, Svitil P., Jendelova P., Sykova E.: Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells.* 2014 Aug 11. IF 7.133

Hejčl A., Růžička J., Kapcalova M., **Turnovcova K.**, Krumbholcova E., Přadny M., Michalek J., Cihlař J., Jendelova P., Sykova E.: Modified methacrylate hydrogels improve tissue repair and stem cell survival in spinal cord injury. *Stem Cells and Development, Stem Cells Dev.* 2013 Oct 15;22(20):2794-805., IF 4.202

Amemori T., Romanyuk N., Jendelova P., Herynek V., **Turnovcova K.**, Prochazka P., Kapcalova M., Cocks G., Price J., and Sykova E.: Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Research & Therapy, Stem Cell Res Ther.* 2013 Jun 7;4(3):68, IF 4.634

11. Seznam literatury

1. Abad M., Mosteiro L., Pantoja C., Cañamero M., Rayon T., Ors I., Graña O., Megías D., Domínguez O., Martínez D., et al., 2013. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* [online]. 17.10., roč. 502, č. 7471, s. 340–345. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature12586
2. Abdulrazzak H., Moschidou D., Jones G. a Guillot P.V., 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 12.6., roč. 7, č. Suppl 6, s. S689–S706 [vid. 26. září 2014]. ISSN 1742-5689, 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2010.0347.focus
3. Adewumi O., International Stem Cell Initiative, Aflatoonian B., Ahrlund-Richter L., Amit M., Andrews P.W., Beighton G., Bello P.A., Benvenisty N., Berry L.S., et al., 2007. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology* [online]. 7., roč. 25, č. 7, s. 803–816. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1318
4. Afrooz A.R.M.N., Sivalapalan S.T., Murphy C.J., Hussain S.M., Schlager J.J. a Saleh N.B., 2013. Spheres vs. rods: the shape of gold nanoparticles influences aggregation and deposition behavior. *Chemosphere* [online]. 3., roč. 91, č. 1, s. 93–98. ISSN 1879-1298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.031
5. Aigner S., Sthoeger Z.M., Fogel M., Weber E., Zarn J., Ruppert M., Zeller Y., Vestweber D., Stahel R., Sammar M., et al., 1997. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*. 1.5., roč. 89, č. 9, s. 3385–3395. ISSN 0006-4971.
6. Altaner C., Altanerova V., Cihova M., Hunakova L., Kaiserova K., Klepanec A., Vulev I. a Madaric J., 2013. Characterization of mesenchymal stem cells of „no-options” patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. *PloS One* [online]. roč. 8, č. 9, s. e73722. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0073722
7. Alt E., Yan Y., Gehmert S., Song Y.-H., Altman A., Gehmert S., Vykoukal D. a Bai X., 2011. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* [online]. 4., roč. 103, č. 4, s. 197–208. ISSN 1768-322X. Dostupné z: doi:10.1042/BC20100117
8. Altman J., 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science (New York, N.Y.)*. 30.3., roč. 135, č. 3509, s. 1127–1128. ISSN 0036-8075.
9. Altman J. a Das G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*. 6., roč. 124, č. 3, s. 319–335. ISSN 0021-9967.
10. Amemori T., Romanyuk N., Jendelova P., Herynek V., Turnovcova K., Prochazka P., Kapcalova M., Cocks G., Price J. a Sykova E., 2013. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 7.6., roč. 4, č. 3, s. 68 [vid. 3. leden 2015]. ISSN 1757-6512. Dostupné z: doi:10.1186/scrt219
11. Andrews P.W., Damjanov I., Simon D., Banting G.S., Carlin C., Dracopoli N.C. a Føgh J., 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell

- line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2., roč. 50, č. 2, s. 147–162. ISSN 0023-6837.
12. Aspord C., Laurin D., Janier M.F., Mandon C.A., Thivolet C., Villiers C., Mowat P., Madec A.-M., Tillement O., Perriat P., et al., 2013. Paramagnetic nanoparticles to track and quantify in vivo immune human therapeutic cells. *Nanoscale* [online]. 9.7. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/c3nr34240a
 13. Ayatollahi M., Soleimani M., Geramizadeh B. a Imanieh M.H., 2011. Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) improves hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell biology international* [online]. 11., roč. 35, č. 11, s. 1169–1176. ISSN 1095-8355. Dostupné z: doi:10.1042/CBI20110016
 14. Babic M., Horák D., Jendelová P., Glogarová K., Herynek V., Trchova M., Likavanová K., Lesný P., Pollert E., Hájek M., et al., 2009. Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate Chemistry*. 2., roč. 20, č. 2, s. 283–294. ISSN 1520-4812.
 15. Babic M., Horák D., Trchová M., Jendelová P., Glogarová K., Lesný P., Herynek V., Hájek M. a Syková E., 2008. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate chemistry* [online]. 3., roč. 19, č. 3, s. 740–750. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc700410z
 16. Baranowska K., Juszczak G., Dmitruk I., Knapp M., Tycińska A., Jakubów P., Adamczuk A., Stankiewicz A. a Hirnle T., 2012. Risk factors of neurological complications in cardiac surgery. *Kardiologia polska*. roč. 70, č. 8, s. 811–818. ISSN 0022-9032.
 17. Barker J.E., 1970. Embryonic mouse peripheral blood colony-forming units. *Nature*. 26.12., roč. 228, č. 5278, s. 1305–1306. ISSN 0028-0836.
 18. Barker R.A., Kendall A.L. a Widner H., 2000. Neural tissue xenotransplantation: what is needed prior to clinical trials in Parkinson's disease? Neural Tissue Xenografting Project. *Cell transplantation*. 4., roč. 9, č. 2, s. 235–246. ISSN 0963-6897.
 19. Bar M. a Chmelová I., 2011. *Péče o pacienta po cévní mozkové příhodě - Neurologie - ZDN* [online] [vid. 19. listopad 2012]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/pece-o-pacienta-po-cevni-mozkove-prihode-457916>
 20. Bartkowska K., Turlejski K. a Djavadian R.L., 2010. Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. roč. 70, č. 4, s. 454–467. ISSN 1689-0035.
 21. Battula V.L., Treml S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., de Zwart P., Müller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E., et al., 2009. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* [online]. 2., roč. 94, č. 2, s. 173–184. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.13740
 22. Belayev L., Alonso O.F., Busto R., Zhao W. a Ginsberg M.D., 1996. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 9., roč. 27, č. 9, s. 1616–1622; discussion 1623. ISSN 0039-2499.
 23. Blandini F., Cova L., Armentero M.-T., Zennaro E., Levandis G., Bossolasco P., Calzarossa C., Mellone M., Giuseppe B., Delilieri G.L., et al., 2010. Transplantation of undifferentiated

- human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplantation* [online]. roč. 19, č. 2, s. 203–217. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368909X479839
24. Boddington S.E., Sutton E.J., Henning T.D., Nedopil A.J., Sennino B., Kim A. a Daldrup-Link H.E., 2011. Labeling human mesenchymal stem cells with fluorescent contrast agents: the biological impact. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging* [online]. 2., roč. 13, č. 1, s. 3–9. ISSN 1860-2002. Dostupné z: doi:10.1007/s11307-010-0322-0
 25. Bojar M., Černý R., Kolbel F. a Šroubek J., 2002. Cévní onemocnění mozku a míchy. *Postgraduální medicína*. roč. 2012, č. 9, s. 955–964.
 26. Boltze J., Schmidt U.R., Reich D.M., Kranz A., Reymann K.G., Strassburger M., Lobsien D., Wagner D.-C., Förchler A. a Schäbitz W.-R., 2012. Determination of the therapeutic time window for human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation following experimental stroke in rats. *Cell Transplantation* [online]. roč. 21, č. 6, s. 1199–1211. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368911X589609
 27. Borlongan C.V. a Hess D.C., 2006. New hope for stroke patients: mobilization of endogenous stem cells. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* [online]. 28.3., roč. 174, č. 7, s. 954–955. ISSN 1488-2329. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.060199
 28. Brinton R.D. a Wang J.M., 2006. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Current Alzheimer research*. 7., roč. 3, č. 3, s. 185–190. ISSN 1567-2050.
 29. Broxmeyer H.E., Orschell C.M., Clapp D.W., Hangoc G., Cooper S., Plett P.A., Liles W.C., Li X., Graham-Evans B., Campbell T.B., et al., 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine* [online]. 18.4., roč. 201, č. 8, s. 1307–1318. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20041385
 30. Bruthans J., 2009. Epidemiologie a prognóza cévních mozkových příhod. *Remedia : farmakoterapeutický dvouměsíčník pro lékaře a farmaceuty*. roč. 19, č. 2, s. 128–131.
 31. Bühring H.-J., Battula V.L., Tremml S., Schewe B., Kanz L. a Vogel W., 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 6., roč. 1106, s. 262–271. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1392.000
 32. Bühring H.-J., Tremml S., Cerabona F., de Zwart P., Kanz L. a Sobiesiak M., 2009. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 9., roč. 1176, s. 124–134. ISSN 1749-6632. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04564.x
 33. Calaora V., Chazal G., Nielsen P.J., Rougon G. a Moreau H., 1996. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience*. 7., roč. 73, č. 2, s. 581–594. ISSN 0306-4522.
 34. Cantarella C., Cayre M., Magalon K. a Durbec P., 2008. Intranasal HB-EGF administration favors adult SVZ cell mobilization to demyelinated lesions in mouse corpus callosum. *Developmental neurobiology* [online]. 1.2., roč. 68, č. 2, s. 223–236. ISSN 1932-8451. Dostupné z: doi:10.1002/dneu.20588

35. Capelli C., Domenghini M., Borleri G., Bellavita P., Poma R., Carobbio A., Micò C., Rambaldi A., Golay J. a Inrona M., 2007. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 6.8., roč. 40, č. 8, s. 785–791 [vid. 4. leden 2015]. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bmt.1705798
36. Caplan A.I., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology* [online]. 1., roč. 217, č. 2, s. 318–324. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:10.1002/path.2469
37. Carletti B., Piemonte F. a Rossi F., 2011. Neuroprotection: The Emerging Concept of Restorative Neural Stem Cell Biology for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology* [online]. 6., roč. 9, č. 2, s. 313–317 [vid. 24. září 2014]. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/157015911795596603
38. Carswell H.V., Anderson N.H., Morton J.J., McCulloch J., Dominiczak A.F. a Macrae I.M., 2000. Investigation of estrogen status and increased stroke sensitivity on cerebral blood flow after a focal ischemic insult. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. 6., roč. 20, č. 6, s. 931–936. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1097/00004647-200006000-00005
39. Catalá A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 1., roč. 157, č. 1, s. 1–11. ISSN 1873-2941. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004
40. Cerebrovaskulární sekce České neurologické společnosti ČLS JEP, 2015. *Cerebrovaskulární sekce České neurologické společnosti ČLS JEP* [online]. Dostupné z: http://www.cmp.cz/jnp/cz/doporucene_postupy_pro_lecbu_cmp/cv_sekce_ceske_neurologicke_spolecnosti.html
41. ClinicalTrials.gov, 2014. *Home - ClinicalTrials.gov* [online] [vid. 26. srpen 2014 a]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/>
42. ClinicalTrials.gov, 2013. *Search of: „mesenchymal stem cells” AND „autoimmune disease” - List Results - ClinicalTrials.gov* [online] [vid. 6. leden 2013 b]. Dostupné z: <http://clinicaltrial.gov/ct2/results?term=%22mesenchymal+stem+cells%22+AND+%22autoimmune+disease%22&pg=2>
43. Conget P.A. a Minguell J.J., 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular physiology* [online]. 10., roč. 181, č. 1, s. 67–73. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<67::AID-JCP7>3.0.CO;2-C
44. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., et al., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* [online]. 1.1., roč. 107, č. 1, s. 367–372. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-07-2657
45. Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A. Jr, Orellana M.D., Freitas M.C.C., Neder L., Santos A.R.D., Peres L.C., Jamur M.C., et al., 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology* [online]. 5., roč. 36, č. 5, s. 642–654. ISSN 0301-472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2007.12.015

46. Cramer S.C., Koroshetz W.J. a Finklestein S.P., 2007. The Case for Modality-Specific Outcome Measures in Clinical Trials of Stroke Recovery-Promoting Agents. *Stroke* [online]. 4.1., roč. 38, č. 4, s. 1393–1395 [vid. 21. říjen 2014]. ISSN 0039-2499, 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.0000260087.67462.80
47. Creer D.J., Romberg C., Saksida L.M., van Praag H. a Bussey T.J., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2.2., roč. 107, č. 5, s. 2367–2372. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0911725107
48. Crigler L., Robey R.C., Asawachaicharn A., Gaupp D. a Phinney D.G., 2006. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Experimental neurology* [online]. 3., roč. 198, č. 1, s. 54–64. ISSN 0014-4886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.029
49. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.-W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., et al., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* [online]. 11.9., roč. 3, č. 3, s. 301–313. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
50. Dahéron L., Opitz S.L., Zaehres H., Lensch M.W., Lensch W.M., Andrews P.W., Itskovitz-Eldor J. a Daley G.Q., 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. roč. 22, č. 5, s. 770–778. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.22-5-770
51. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A. a Colombo R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 3., roč. 329, č. 1-2, s. 23–38. ISSN 0009-8981.
52. Darsalia V., Allison S.J., Cusulin C., Monni E., Kuzdas D., Kallur T., Lindvall O. a Kokaia Z., 2011. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. 1., roč. 31, č. 1, s. 235–242. ISSN 1559-7016. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.2010.81
53. Dávalos A., Toni D., Iweins F., Lesaffre E., Bastianello S. a Castillo J., 1999. Neurological Deterioration in Acute Ischemic Stroke Potential Predictors and Associated Factors in the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) I. *Stroke* [online]. 12.1., roč. 30, č. 12, s. 2631–2636 [vid. 19. listopad 2012]. ISSN 0039-2499, 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.30.12.2631
54. De Barros S., Dehez S., Arnaud E., Barreau C., Cazavet A., Perez G., Galinier A., Casteilla L. a Planat-Bénard V., 2013. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* [online]. 2., roč. 21, č. 2, s. 399–408. ISSN 1525-0024. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2012.213
55. De Clercq E., 2003. The bicyclam AMD3100 story. *Nature reviews. Drug discovery* [online]. 7., roč. 2, č. 7, s. 581–587. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd1134
56. Dengler T.J. a Katus H.A., 2002. Stem cell therapy for the infarcted heart („cellular cardiomyoplasty“). *Herz* [online]. 11., roč. 27, č. 7, s. 598–610. ISSN 0340-9937. Dostupné z: doi:10.1007/s00059-002-2412-5

57. Dietzel F., 1983. Basic principles in hyperthermic tumor therapy. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*. roč. 86, s. 177–190. ISSN 0080-0015.
58. Dirks P.B., 2008. Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* [online]. 12.1., roč. 363, č. 1489, s. 139–152. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2006.2017
59. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. a Horwitz E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [online]. roč. 8, č. 4, s. 315–317. ISSN 1465-3249. Dostupné z: doi:10.1080/14653240600855905
60. Donaldson K., Poland C.A. a Schins R.P.F., 2010. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* [online]. 12., roč. 4, s. 414–420. ISSN 1743-5404. Dostupné z: doi:10.3109/17435390.2010.482751
61. Drukker M. a Benvenisty N., 2004. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends in Biotechnology* [online]. 3., roč. 22, č. 3, s. 136–141. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2004.01.003
62. Duscher D., Rennert R.C., Januszyk M., Anghel E., Maan Z.N., Whittam A.J., Perez M.G., Kosaraju R., Hu M.S., Walmsley G.G., et al., 2014. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Scientific Reports* [online]. 21.11., roč. 4 [vid. 9. leden 2015]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep07144
63. Duverger D. a MacKenzie E.T., 1988. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. 8., roč. 8, č. 4, s. 449–461. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.1988.86
64. Ehler E., Bednařík J., Höschl C., Winkler P., Suchý M. a Pátá M., 2013. Náklady na poruchy mozku v České republice. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 17.4., roč. 76, č. 3, s. 282–291. ISSN 1210-7859.
65. Engela A.U., Baan C.C., Dor F.J.M.F., Weimar W. a Hoogduijn M.J., 2012. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 18.5., roč. 3 [vid. 3. říjen 2013]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2012.00126
66. Erceg S., Ronaghi M. a Stojković M., 2009. Human Embryonic Stem Cell Differentiation Toward Regional Specific Neural Precursors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 1., roč. 27, č. 1, s. 78–87 [vid. 16. prosinec 2014]. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2008-0543
67. Evans M.J. a Kaufman M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 9.7., roč. 292, č. 5819, s. 154–156. ISSN 0028-0836.
68. Farkas E. a Luiten P.G., 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* [online]. 8., roč. 64, č. 6, s. 575–611 [vid. 5. leden 2013]. ISSN 0301-0082. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-0082(00)00068-X

69. Fekete N., Gadelorge M., Fürst D., Maurer C., Dausend J., Fleury-Cappellesso S., Mailänder V., Lotfi R., Ignatius A., Sensebé L., et al., 2012. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* [online]. 5., roč. 14, č. 5, s. 540–554. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.3109/14653249.2012.655420
70. Feltri M.L., Graus Porta D., Previtali S.C., Nodari A., Migliavacca B., Cassetti A., Littlewood-Evans A., Reichardt L.F., Messing A., Quattrini A., et al., 2002. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *The Journal of Cell Biology* [online]. 7.1., roč. 156, č. 1, s. 199–209. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200109021
71. Fink J.S., Schumacher J.M., Ellias S.L., Palmer E.P., Saint-Hilaire M., Shannon K., Penn R., Starr P., VanHorne C., Kott H.S., et al., 2000. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell transplantation*. 4., roč. 9, č. 2, s. 273–278. ISSN 0963-6897.
72. Fiorina P., Pietramaggiori G., Scherer S.S., Jurewicz M., Mathews J.C., Vergani A., Thomas G., Orsenigo E., Staudacher C., La Rosa S., et al., 2010. The mobilization and effect of endogenous bone marrow progenitor cells in diabetic wound healing. *Cell transplantation* [online]. roč. 19, č. 11, s. 1369–1381. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368910X514288
73. Forostyak S., Homola A., Turnovcova K., Svitil P., Jendelova P. a Sykova E., 2014. Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 12., roč. 32, č. 12, s. 3163–3172. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1812
74. Fox G., Gallacher D., Shevde S., Loftus J. a Swayne G., 1993. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 12., roč. 24, č. 12, s. 2087–2092; discussion 2092–2093. ISSN 0039-2499.
75. Frank J.A., Anderson S.A., Kalsih H., Jordan E.K., Lewis B.K., Yocum G.T. a Arbab A.S., 2004. Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging. *Cytotherapy*. roč. 6, č. 6, s. 621–625. ISSN 1465-3249.
76. Freret T., Chazalviel L., Roussel S., Bernaudin M., Schumann-Bard P. a Boulouard M., 2006. Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behavioral neuroscience* [online]. 12., roč. 120, č. 6, s. 1285–1298. ISSN 0735-7044. Dostupné z: doi:10.1037/0735-7044.120.6.1285
77. Furlan A.J., Eyding D., Albers G.W., Al-Rawi Y., Lees K.R., Rowley H.A., Sachara C., Soehngen M., Warach S. a Hacke W., 2006. Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke; a journal of cerebral circulation* [online]. 5., roč. 37, č. 5, s. 1227–1231. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.0000217403.66996.6d
78. Furlow T.W. Jr, 1982. Experimental air embolism of the brain: an analysis of the technique in the rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 12., roč. 13, č. 6, s. 847–852. ISSN 0039-2499.

79. Ginsberg M.D. a Busto R., 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 12., roč. 20, č. 12, s. 1627–1642. ISSN 0039-2499.
80. Gocht A., Struckhoff G. a Lhler J., 1996. CD15-containing glycoconjugates in the central nervous system. *Histology and Histopathology*. 10., roč. 11, č. 4, s. 1007–1028. ISSN 0213-3911.
81. Goldemund D., Mikulík R. a Reif M., 2008. Trombolytická terapie mozkového infarktu. *Kardiologická revue* [online]. Dostupné z: <http://www.kardiologickarevue.cz/>
82. Goldman S.A., 2004. Directed mobilization of endogenous neural progenitor cells: the intersection of stem cell biology and gene therapy. *Current opinion in molecular therapeutics*. 10., roč. 6, č. 5, s. 466–472. ISSN 1464-8431.
83. Graus-Porta D., Blaess S., Senften M., Littlewood-Evans A., Damsky C., Huang Z., Orban P., Klein R., Schittny J.C. a Müller U., 2001. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron*. 16.8., roč. 31, č. 3, s. 367–379. ISSN 0896-6273.
84. Greco S.J., Zhou C., Ye J.-H. a Rameshwar P., 2007. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* [online]. 10., roč. 16, č. 5, s. 811–826. ISSN 1547-3287. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2007.0011
85. Griffin M.D., Ritter T. a Mahon B.P., 2010. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Human gene therapy* [online]. 12., roč. 21, č. 12, s. 1641–1655. ISSN 1557-7422. Dostupné z: doi:10.1089/hum.2010.156
86. Griffiths S., Baraniak P.R., Copland I.B., Nerem R.M. a McDevitt T.C., 2013. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy* [online]. 12., roč. 15, č. 12, s. 1469–1483. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.020
87. Guillot P.V., Gotherstrom C., Chan J., Kurata H. a Fisk N.M., 2007. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 3., roč. 25, č. 3, s. 646–654. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2006-0208
88. Gunduz U., Keskin T., Tansik G., Mutlu P., Yalcin S., Unsoy G., Yakar A., Khodadust R. a Gunduz G., 2014. Idarubicin-loaded folic acid conjugated magnetic nanoparticles as a targetable drug delivery system for breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 22.8. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2014.08.013
89. Guo J.-J., Liu F., Sun X., Huang J.-J., Xu M. a Sun F.-Y., 2012. Bcl-2 enhances the formation of newborn striatal long-projection neurons in adult rat brain after a transient ischemic stroke. *Neuroscience Bulletin* [online]. 12., roč. 28, č. 6, s. 669–679. ISSN 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-012-1288-5
90. Gupta A.K. a Gupta M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* [online]. 6., roč. 26, č. 18, s. 3995–4021. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
91. Gupta A.K., Naregalkar R.R., Vaidya V.D. a Gupta M., 2007. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications.

Nanomedicine [online]. roč. 2, č. 1, s. 23–39 [vid. 30. květen 2014]. ISSN 1743-5889. Dostupné z: doi:10.2217/17435889.2.1.23

92. Guzman R., Uchida N., Bliss T.M., He D., Christopherson K.K., Stellwagen D., Capela A., Greve J., Malenka R.C., Moseley M.E., et al., 2007. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 12.6., roč. 104, č. 24, s. 10211–10216 [vid. 29. prosinec 2014]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0608519104
93. Hackett C., Knight J. a Mao-Draayer Y., 2014. Transplantation of Fas-deficient or wild-type neural stem/progenitor cells (NPCs) is equally efficient in treating experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *American Journal of Translational Research*. roč. 6, č. 2, s. 119–128. ISSN 1943-8141.
94. Hall P.E., Lathia J.D., Miller N.G.A., Caldwell M.A. a French-Constant C., 2006. Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 9., roč. 24, č. 9, s. 2078–2084. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2005-0595
95. Hanini A., Schmitt A., Kacem K., Chau F., Ammar S. a Gavard J., 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *International Journal of Nanomedicine* [online]. roč. 6, s. 787–794. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S17574
96. Hawryluk G.W.J., Mothe A., Wang J., Wang S., Tator C. a Fehlings M.G., 2012. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem cells and development* [online]. 10.8., roč. 21, č. 12, s. 2222–2238. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2011.0596
97. Hayer S., Steiner G., Görtz B., Reiter E., Tohidast-Akrad M., Amling M., Hoffmann O., Redlich K., Zwerina J., Skriner K., et al., 2005. CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 21.3., roč. 201, č. 6, s. 903–914. ISSN 0022-1007. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20040852
98. Hejčl A., Růžicka J., Kapcalová M., Turnovcová K., Krumbholcová E., Přádný M., Michálek J., Cihlár J., Jendelová P. a Syková E., 2013. Adjusting the Chemical and Physical Properties of Hydrogels Leads to Improved Stem Cell Survival and Tissue Ingrowth in Spinal Cord Injury Reconstruction: A Comparative Study of Four Methacrylate Hydrogels. *Stem cells and development* [online]. 19.7. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2012.0616
99. Henning T.D., Sutton E.J., Kim A., Golovko D., Horvai A., Ackerman L., Sennino B., McDonald D., Lotz J. a Daldrup-Link H.E., 2009. The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Contrast Media & Molecular Imaging* [online]. 8., roč. 4, č. 4, s. 165–173. ISSN 1555-4317. Dostupné z: doi:10.1002/cmml.276
100. Heyn C., Bowen C.V., Rutt B.K. a Foster P.J., 2005. Detection threshold of single SPIO-labeled cells with FIESTA. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 2., roč. 53, č. 2, s. 312–320. ISSN 0740-3194. Dostupné z: doi:10.1002/mrm.20356
101. Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R. a Riess H., 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 7., roč. 43, č. 1, s. 33–56. ISSN 1040-8428.
102. Hong S., Kang U.J., Isacson O. a Kim K.-S., 2008. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to

- differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1., roč. 104, č. 2, s. 316–324. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04952.x
103. Horák D., Babic M., Jendelová P., Herynek V., M. T., Likavčanová K., Kapcalová M., Hájek M. a Syková E., 2009. The effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J. Magn. Mat. n Mater.* roč. 2009, č. 321, s. 1539–1547.
 104. Horak D., Babic M., Jendelová P., Herynek V., Trchová M., Pientka Z., Pollert E., Hájek M. a Syková E., 2007. D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate chemistry* [online]. 6., roč. 18, č. 3, s. 635–644. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc060186c
 105. Chen B., Wu W. a Wang X., 2011. Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy. *Current cancer drug targets.* 2., roč. 11, č. 2, s. 184–189. ISSN 1873-5576.
 106. Chen C.-C.V., Ku M.-C., D. M. J., Lai J.-S., Hueng D.-Y. a Chang C., 2013. Simple SPION Incubation as an Efficient Intracellular Labeling Method for Tracking Neural Progenitor Cells Using MRI. *PLoS ONE* [online]. roč. 8, č. 2, s. e56125 [vid. 12. leden 2015]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0056125
 107. Chen S.-J., Chang C.-M., Tsai S.-K., Chang Y.-L., Chou S.-J., Huang S.-S., Tai L.-K., Chen Y.-C., Ku H.-H., Li H.-Y., et al., 2010. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem cells and development* [online]. 11., roč. 19, č. 11, s. 1757–1767. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2009.0452
 108. Chopp M., Li Y. a Zhang J., 2008. Plasticity and remodeling of brain. *Journal of the neurological sciences* [online]. 15.2., roč. 265, č. 1-2, s. 97–101. ISSN 0022-510X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jns.2007.06.013
 109. Chopp M., Li Y. a Zhang Z.G., 2009. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke; a journal of cerebral circulation* [online]. 3., roč. 40, č. 3 Suppl, s. S143–145. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.108.533141
 110. Chrissobolis S., Miller A.A., Drummond G.R., Kemp-Harper B.K. a Sobey C.G., 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* roč. 16, s. 1733–1745. ISSN 1093-4715.
 111. Ishibashi S., Sakaguchi M., Kuroiwa T., Yamasaki M., Kanemura Y., Shizuko I., Shimazaki T., Onodera M., Okano H. a Mizusawa H., 2004. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 15.10., roč. 78, č. 2, s. 215–223. ISSN 0360-4012. Dostupné z: doi:10.1002/jnr.20246
 112. Jacobs S.A., Pinxteren J., Roobrouck V.D., Luyckx A., Hof W.V., Deans R., Verfaillie C.M., Waer M., Billiau A.D. a Van Gool S.W., 2013. Human multipotent adult progenitor cells are nonimmunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T-cell responses. *Cell transplantation* [online]. roč. 22, č. 10, s. 1915–1928. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368912X657369
 113. Jedlička P. a Keller O., 2005. *Speciální neurologie*. B.m.: Galén. ISBN 8072623125.

114. Jendelová P., Herynek V., DeCroos J., Glogarová K., Andersson B., Hájek M. a Syková E., 2003. Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 10., roč. 50, č. 4, s. 767–776. ISSN 0740-3194. Dostupné z: doi:10.1002/mrm.10585
115. Jhaveri D.J., Mackay E.W., Hamlin A.S., Marathe S.V., Nandam L.S., Vaidya V.A. a Bartlett P.F., 2010. Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. 17.2., roč. 30, č. 7, s. 2795–2806. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3780-09.2010
116. Jiang M., Lv L., Ji H., Yang X., Zhu W., Cai L., Gu X., Chai C., Huang S., Sun J., et al., 2011. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 8., roč. 354, č. 1-2, s. 67–75. ISSN 1573-4919. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-011-0806-5
117. Jin-qiao S., Bin S., Wen-hao Z. a Yi Y., 2009. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain & development* [online]. 5., roč. 31, č. 5, s. 331–340. ISSN 1872-7131. Dostupné z: doi:10.1016/j.braindev.2008.06.005
118. Jo J., Aoki I. a Tabata Y., 2010. Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 19.3., roč. 142, č. 3, s. 465–473. ISSN 1873-4995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.11.014
119. Jones E. a McGonagle D., 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* [online]. 2.1., roč. 47, č. 2, s. 126–131 [vid. 25. srpen 2014]. ISSN 1462-0324, 1462-0332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kem206
120. Jungebluth P., Alici E., Baiguera S., Le Blanc K., Blomberg P., Bozóky B., Crowley C., Einarsson O., Grinnemo K.-H., Gudbjartsson T., et al., 2011. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet* [online]. 10.12., roč. 378, č. 9808, s. 1997–2004. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(11)61715-7
121. Jung J., Moon N., Ahn J.-Y., Oh E.-J., Kim M., Cho C.-S., Shin J.-C. a Oh I.-H., 2009. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells and Development* [online]. 5., roč. 18, č. 4, s. 559–571. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2008.0105
122. Kania G., Corbeil D., Fuchs J., Tarasov K.V., Blyszczuk P., Huttner W.B., Boheler K.R. a Wobus A.M., 2005. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 7., roč. 23, č. 6, s. 791–804. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2004-0232
123. Kapoor K., Singh B. a Dewan L.I.J., 2008. Variations in the configuration of the circle of Willis. *Anatomical science international* [online]. 6., roč. 83, č. 2, s. 96–106. ISSN 1447-6959. Dostupné z: doi:10.1111/j.1447-073X.2007.00216.x
124. Kassem M., Kristiansen M. a Abdallah B.M., 2004. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 11., roč. 95, č. 5, s. 209–214. ISSN 1742-7835. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto950502.x

125. Kawai H., Yamashita T., Ohta Y., Deguchi K., Nagotani S., Zhang X., Ikeda Y., Matsuura T. a Abe K., 2010. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. 8., roč. 30, č. 8, s. 1487–1493. ISSN 1559-7016. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.2010.32
126. Ketkar-Atre A., Struys T., Soenen S.J., Lambrichts I., Verfaillie C.M., De Cuyper M. a Himmelreich U., 2013. Variability in contrast agent uptake by different but similar stem cell types. *International Journal of Nanomedicine* [online]. roč. 8, s. 4577–4591. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S51588
127. Khan S.S., Solomon M.A. a McCoy J.P. Jr, 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* [online]. 3., roč. 64, č. 1, s. 1–8. ISSN 1552-4949. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.20040
128. Kievit F.M. a Zhang M., 2011. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Accounts of chemical research* [online]. 18.10., roč. 44, č. 10, s. 853–862 [vid. 30. květen 2014]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar2000277
129. Kim D.-S., Lee J.S., Leem J.W., Huh Y.J., Kim J.Y., Kim H.-S., Park I.-H., Daley G.Q., Hwang D.-Y. a Kim D.-W., 2010. Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Reviews* [online]. 6., roč. 6, č. 2, s. 270–281. ISSN 1558-6804. Dostupné z: doi:10.1007/s12015-010-9138-1
130. Kim H.J. a Sun W., 2012. Adult neurogenesis in the central and peripheral nervous systems. *International neurology journal* [online]. 6., roč. 16, č. 2, s. 57–61. ISSN 2093-6931. Dostupné z: doi:10.5213/inj.2012.16.2.57
131. Knudtzon S., 1974. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*. 3., roč. 43, č. 3, s. 357–361. ISSN 0006-4971.
132. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T. a Ooneda G., 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke*. roč. 1986, č. 8, s. 1 – 8.
133. Kokaia Z., 2013. Neurogenesis and stem cell transplantation strategies for stroke. In: *FENS Featured Regional Meeting*. Praha.
134. Kostura L., Kraitchman D.L., Mackay A.M., Pittenger M.F. a Bulte J.W.M., 2004. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR in biomedicine* [online]. 11., roč. 17, č. 7, s. 513–517. ISSN 0952-3480. Dostupné z: doi:10.1002/nbm.925
135. Kozubenko N., Turnovcova K., Kapcalova M., Butenko O., Anderova M., Rusnakova V., Kubista M., Hampl A., Jendelova P. a Sykova E., 2010. Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell transplantation* [online]. roč. 19, č. 4, s. 471–486. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368909X484707
136. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., Simpson E. a Dazzi F., 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* [online]. 1.5., roč. 101, č. 9, s. 3722–3729. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-07-2104

137. Kumar S. a Ponnazhagan S., 2012. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect. *Bone* [online]. 4., roč. 50, č. 4, s. 1012–1018. ISSN 1873-2763. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2012.01.027
138. Laing R.J., Jakubowski J. a Laing R.W., 1993. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2., roč. 24, č. 2, s. 294–297; discussion 297–298. ISSN 0039-2499.
139. Lama S., Qiao M., Kirton A., Sun S., Cheng E., Foniok T. a Tuor U.I., 2011. Imaging corticospinal degeneration in neonatal rats with unilateral cerebral infarction. *Experimental Neurology* [online]. 4., roč. 228, č. 2, s. 192–199. ISSN 1090-2430. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2011.01.002
140. Leedham S.J. a Wright N.A., 2008. Expansion of a mutated clone: from stem cell to tumour. *Journal of clinical pathology* [online]. 2., roč. 61, č. 2, s. 164–171. ISSN 1472-4146. Dostupné z: doi:10.1136/jcp.2006.044610
141. Li J.-F., Zhang D.-J., Geng T., Chen L., Huang H., Yin H.-L., Zhang Y., Lou J.-Y., Cao B. a Wang Y.-L., 2014. The potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Cell Transplantation* [online]. roč. 23 Suppl 1, s. S113–122. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368914X685005
142. Lipnick S. a Jacobson M., 2006. *Developmental Neurobiology*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 9780387281179.
143. Liu L., Xia H., Belák S. a Baule C., 2008. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *Journal of Virological Methods* [online]. 12., roč. 154, č. 1-2, s. 82–85. ISSN 0166-0934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.001
144. Liu Z.-J. a Velazquez O.C., 2008. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antioxidants & redox signaling* [online]. 11., roč. 10, č. 11, s. 1869–1882. ISSN 1557-7716. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2008.2121
145. Li X.-J., Zhang X., Johnson M.A., Wang Z.-B., Lavaute T. a Zhang S.-C., 2009. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* [online]. 12., roč. 136, č. 23, s. 4055–4063. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.036624
146. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S. a Cummins R., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1., roč. 20, č. 1, s. 84–91. ISSN 0039-2499.
147. Luo Y., 2011. Cell-based therapy for stroke. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)* [online]. 1., roč. 118, č. 1, s. 61–74. ISSN 1435-1463. Dostupné z: doi:10.1007/s00702-010-0478-4
148. Lv F.-J., Tuan R.S., Cheung K.M.C. a Leung V.Y.L., 2014. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 6., roč. 32, č. 6, s. 1408–1419. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1681
149. Mabuchi Y., Houlihan D.D., Akazawa C., Okano H. a Matsuzaki Y., 2013. Prospective Isolation of Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Based on Surface Markers. *Stem Cells International* [online]. roč. 2013 [vid. 5. červen 2014]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/507301

150. Madhavan L., Daley B.F., Paumier K.L. a Collier T.J., 2009. Transplantation of subventricular zone neural precursors induces an endogenous precursor cell response in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of comparative neurology* [online]. 1.7., roč. 515, č. 1, s. 102–115. ISSN 1096-9861. Dostupné z: doi:10.1002/cne.22033
151. Machalińska A., Kłos P., Baumert B., Baśkiewicz M., Kawa M., Rudnicki M., Lubiński W., Wiszniewska B., Karczewicz D. a Machaliński B., 2011. Stem Cells are mobilized from the bone marrow into the peripheral circulation in response to retinal pigment epithelium damage-a pathophysiological attempt to induce endogenous regeneration. *Current eye research* [online]. 7., roč. 36, č. 7, s. 663–672. ISSN 1460-2202. Dostupné z: doi:10.3109/02713683.2011.576796
152. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M. a Gerson S.L., 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology* [online]. 7., roč. 176, č. 1, s. 57–66. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-7
153. Martin G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 12., roč. 78, č. 12, s. 7634–7638. ISSN 0027-8424.
154. Marzesco A.-M., Janich P., Wilsch-Bräuninger M., Dubreuil V., Langenfeld K., Corbeil D. a Huttner W.B., 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of Cell Science* [online]. 1.7., roč. 118, č. Pt 13, s. 2849–2858. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.02439
155. Mazzini L., Ferrero I., Luparello V., Rustichelli D., Gunetti M., Mareschi K., Testa L., Stecco A., Tarletti R., Miglioretti M., et al., 2010. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental Neurology* [online]. 5., roč. 223, č. 1, s. 229–237. ISSN 1090-2430. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.007
156. Ming G.-L. a Song H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* [online]. 26.5., roč. 70, č. 4, s. 687–702. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001
157. Mohapatra S., Rout S.R., Narayan R. a Maiti T.K., 2014. Multifunctional mesoporous hollow silica nanocapsules for targeted co-delivery of cisplatin-pemetrexed and MR imaging. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)* [online]. 16.9. ISSN 1477-9234. Dostupné z: doi:10.1039/c4dt02144d
158. Mojica-Henshaw M.P., Jacobson P., Morris J., Kelley L., Pierce J., Boyer M. a Reems J.-A., 2013. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy* [online]. 12., roč. 15, č. 12, s. 1458–1468. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcyt.2013.06.014
159. Molendijk I., Duijvestein M., van der Meulen-de Jong A.E., van Deen W.K., Swets M., Hommes D.W. a Verspaget H.W., 2012. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease. *Journal of allergy* [online]. roč. 2012, s. 187408. ISSN 1687-9791. Dostupné z: doi:10.1155/2012/187408
160. Montzka K., Führmann T., Müller-Ehmsen J., Wöltje M. a Brook G.A., 2010. Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro

- model of tissue damage. *Cytotherapy* [online]. 11., roč. 12, č. 7, s. 870–880. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.3109/14653249.2010.501789
161. Morizane A., Doi D., Kikuchi T., Nishimura K. a Takahashi J., 2011. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 2., roč. 89, č. 2, s. 117–126. ISSN 1097-4547. Dostupné z: doi:10.1002/jnr.22547
 162. Moskowitz M.A., Lo E.H. a Iadecola C., 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* [online]. 29.7., roč. 67, č. 2, s. 181–198. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2010.07.002
 163. Mourin G., Badia A., Cazes A. a Planquette B., 2012. An unusual cause of pulmonary artery pseudoaneurysm: acrylate embolism. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* [online]. 12., roč. 15, č. 6, s. 1082–1084. ISSN 1569-9285. Dostupné z: doi:10.1093/icvts/ivs314
 164. Mummenthaler M. a Mattle H., 2001. *Neurologie*. Praha: Grada. ISBN 80-7169-545-9.
 165. Nakano-Doi A., Nakagomi T., Fujikawa M., Nakagomi N., Kubo S., Lu S., Yoshikawa H., Soma T., Taguchi A. a Matsuyama T., 2010. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 7., roč. 28, č. 7, s. 1292–1302. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.454
 166. Nečas E., 2009. *Patologická fyziologie orgánových systémů 2*. B.m.: Karolinum. ISBN 978-80-246-1712-1.
 167. Neuhuber B., Swanger S.A., Howard L., Mackay A. a Fischer I., 2008. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental Hematology* [online]. 9., roč. 36, č. 9, s. 1176–1185. ISSN 0301-472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2008.03.019
 168. Nguyen T.D., Widera D., Greiner J., Müller J., Martin I., Slotta C., Hauser S., Kaltschmidt C. a Kaltschmidt B., 2013. Prolonged cultivation of hippocampal neural precursor cells shifts their differentiation potential and selects for aneuploid cells. *Biological Chemistry* [online]. 12., roč. 394, č. 12, s. 1623–1636. ISSN 1437-4315. Dostupné z: doi:10.1515/hsz-2013-0191
 169. Nistor G., Siegenthaler M.M., Poirier S.N., Rossi S., Poole A.J., Charlton M.E., McNeish J.D., Airriess C.N. a Keirstead H.S., 2011. Derivation of high purity neuronal progenitors from human embryonic stem cells. *PloS One* [online]. roč. 6, č. 6, s. e20692. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0020692
 170. Novotná B., Turnovcová K., Veverka M., Rossner P., Bagryantseva Y., Herynek V., Zvatora P., Vosmanska M., Syková E. a Jendelová P., 2015. Biological effect of cobalt zinc ferrite nanoparticles in rat bone marrow mesenchymal cells. *Nanotoxicology*.
 171. O'Donoghue K. a Fisk N.M., 2004. Fetal stem cells. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* [online]. 12., roč. 18, č. 6, s. 853–875. ISSN 1521-6934. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010
 172. Onteniente B., 2013. The Multiple Aspects of Stroke and Stem Cell Therapy. *Current Molecular Medicine* [online]. 1.5., roč. 13, č. 5, s. 821–831 [vid. 21. říjen 2014]. ISSN 15665240. Dostupné z: doi:10.2174/1566524011313050013

173. Onteniente B. a Polentes J., 2011. Regenerative Medicine for Stroke – Are We There Yet. *Cerebrovascular Diseases* [online]. roč. 31, č. 6, s. 544–551 [vid. 3. leden 2015]. ISSN 1421-9786, 1015-9770. Dostupné z: doi:10.1159/000324325
174. Panchision D.M., Chen H.-L., Pistollato F., Papini D., Ni H.-T. a Hawley T.S., 2007. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 6., roč. 25, č. 6, s. 1560–1570. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2006-0260
175. Panneerselvam K. a Freeze H.H., 1996. Mannose Enters Mammalian Cells Using a Specific Transporter That Is Insensitive to Glucose. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 19.4., roč. 271, č. 16, s. 9417–9421 [vid. 6. leden 2015]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.16.9417
176. Paul G., Özen I., Christophersen N.S., Reinbothe T., Bengzon J., Visse E., Jansson K., Dannaus K., Henriques-Oliveira C., Roybon L., et al., 2012. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PloS one* [online]. roč. 7, č. 4, s. e35577. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035577
177. Peh G.S.-L., Lang R.J., Pera M.F. a Hawes S.M., 2009. CD133 expression by neural progenitors derived from human embryonic stem cells and its use for their prospective isolation. *Stem Cells and Development* [online]. 3., roč. 18, č. 2, s. 269–282. ISSN 1557-8534. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2008.0124
178. Penar P.L., 1987. A model of embolic cerebral ischemia in the rat. *Experimental neurology*. 5., roč. 96, č. 2, s. 393–405. ISSN 0014-4886.
179. Penha E.M., Meira C., Santana S., Guimarã, Es E.T., Mendonç, A M.V., Pinheiro C., Gravely F.A., Pinheiro C., et al., 2014. Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. *Stem Cells International* [online]. 25.2., roč. 2014, s. e437521 [vid. 4. leden 2015]. ISSN 1687-966X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/437521
180. Pfannkuche K., Hannes T., Khalil M., Noghabi M.S., Morshedi A., Hescheler J. a Dröge P., 2010. Induced pluripotent stem cells: a new approach for physiological research. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* [online]. roč. 26, č. 2, s. 105–124. ISSN 1421-9778. Dostupné z: doi:10.1159/000320514
181. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S. a Marshak D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*. 2.4., roč. 284, č. 5411, s. 143–147. ISSN 0036-8075.
182. Pleasure S.J., Page C. a Lee V.M., 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 5., roč. 12, č. 5, s. 1802–1815. ISSN 0270-6474.
183. Pluchino S., Zanotti L., Rossi B., Brambilla E., Ottoboni L., Salani G., Martinello M., Cattalini A., Bergami A., Furlan R., et al., 2005. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* [online]. 14.7., roč. 436, č. 7048, s. 266–271. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03889

184. Pollert E., Kaman O., Veverka P., Veverka M., Marysko M., Záveta K., Kacenka M., Lukes I., Jendelová P., Kaspar P., et al., 2010. Core-shell La(1-x)Sr(x)MnO₃ nanoparticles as colloidal mediators for magnetic fluid hyperthermia. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* [online]. 28.9., roč. 368, č. 1927, s. 4389–4405. ISSN 1364-503X. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2010.0123
185. Pollock K., Stroemer P., Patel S., Stevanato L., Hope A., Miljan E., Dong Z., Hodges H., Price J. a Sinden J.D., 2006. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Experimental neurology* [online]. 5., roč. 199, č. 1, s. 143–155. ISSN 0014-4886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2005.12.011
186. Popelová J., 2003. Otevřené foramen ovale a paradoxní embolie - jak dál? *Intervenční a akutní kardiologie*. roč. 2003, č. 2, s. 51.
187. Pouponneau P., Bringout G. a Martel S., 2014. Therapeutic magnetic microcarriers guided by magnetic resonance navigation for enhanced liver chemoembilization: a design review. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 5., roč. 42, č. 5, s. 929–939. ISSN 1573-9686. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-014-0972-1
188. Prieto R., Carceller F., Roda J.M. a Avendaño C., 2005. The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurological research* [online]. 1., roč. 27, č. 1, s. 47–52. ISSN 0161-6412. Dostupné z: doi:10.1179/016164105X18214
189. Pruszek J., Ludwig W., Blak A., Alavian K. a Isacson O., 2009. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 12., roč. 27, č. 12, s. 2928–2940. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.211
190. Pruszek J., Sonntag K.-C., Aung M.H., Sanchez-Pernaute R. a Isacson O., 2007. Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 9., roč. 25, č. 9, s. 2257–2268. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2006-0744
191. Pusic I. a DiPersio J.F., 2010. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Current opinion in hematology* [online]. 7., roč. 17, č. 4, s. 319–326. ISSN 1531-7048. Dostupné z: doi:10.1097/MOH.0b013e328338b7d5
192. Radu M., Munteanu M.C., Petrache S., Serban A.I., Dinu D., Hermenean A., Sima C. a Dinischiotu A., 2010. Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Acta Biochimica Polonica*. roč. 57, č. 3, s. 355–360. ISSN 1734-154X.
193. Rasmusson I., Ringdén O., Sundberg B. a Le Blanc K., 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* [online]. 27.10., roč. 76, č. 8, s. 1208–1213. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/01.TP.0000082540.43730.80
194. Ringleb P.A., Bousser G.-M., Michael Brainin Álvaro Cervera, Barcelona, Španělsko; Angel Chamorro, Barcelona, Španělsko; Charlotte Cordonnier, Lille, Francie; László Csiba, Debrecen, Maďarsko; Antoni Davalos, Barcelona, Španělsko; Hans-Christoph Diener, Essen, Německo; José Ferro, Lisbon, Portugalsko; Werner Hacke, Heidelberg, Německo; Michael Hennerici, Mannheim, Německo; Markku Kaste, Helsinki, Finsko; Peter Langhorne, Glasgow, Velká Británie; Kennedy Lees, Glasgow, Velká Británie; Didier Leys, Lille, Francie; Jan

- Lodder, Maastricht, Nizozemí; Hugh S., Markus, London, Velká Británie; Jean-Louis Mas, Paříž, Francie; Heinrich P. Mattle, Bern, et al., 2008. *Management ischemické cévní mozkové příhody a tranzitorní ischemické ataky - doporučení European Stroke Organisation (ESO) 2008, aktualizace leden 2009* [online]. 2008. Dostupné z: http://www.eso-stroke.org/fileadmin/files/2013/eso-stroke/pdf/ESO_Guidelines_CZ.pdf
195. Risom L., Dybdahl M., Bornholdt J., Vogel U., Wallin H., Møller P. a Loft S., 2003. Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* [online]. 11., roč. 24, č. 11, s. 1847–1852. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgg144
 196. Robin A.M., Zhang Z.G., Wang L., Zhang R.L., Katakowski M., Zhang L., Wang Y., Zhang C. a Chopp M., 2006. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. 1., roč. 26, č. 1, s. 125–134. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jcbfm.9600172
 197. Romanyuk N., Amemori T., Turnovcova K., Prochazka P., Onteniente B., Sykova E. a Jendelova P., 2014. Beneficial effect of human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair. *Cell Transplantation* [online]. 19.8. ISSN 1555-3892. Dostupné z: doi:10.3727/096368914X684042
 198. Romieu-Mourez R., François M., Boivin M.-N., Stagg J. a Galipeau J., 2007. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1.8., roč. 179, č. 3, s. 1549–1558. ISSN 0022-1767.
 199. Řehoř I., Vilímová V., Jendelová P., Kubíček V., Jiráček D., Herynek V., Kapcalová M., Kotek J., Černý J., Hermann P., et al., 2011. Phosphonate-titanium dioxide assemblies: platform for multimodal diagnostic-therapeutic nanoprobe. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 28.7., roč. 54, č. 14, s. 5185–5194. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm200449y
 200. Saha B., Jaber M. a Gaillard A., 2012. Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Frontiers in cellular neuroscience* [online]. roč. 6, s. 14. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2012.00014
 201. Samy K.P., Martin B.M., Turgeon N.A. a Kirk A.D., 2014. Islet cell xenotransplantation: a serious look toward the clinic. *Xenotransplantation* [online]. 5., roč. 21, č. 3, s. 221–229. ISSN 1399-3089. Dostupné z: doi:10.1111/xen.12095
 202. Sandercock P., Lindley R., Wardlaw J., Dennis M., Lewis S., Venables G., Kobayashi A., Czlonkowska A., Berge E., Slot K.B., et al., 2008. The third international stroke trial (IST-3) of thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Trials* [online]. 17.6., roč. 9, s. 37 [vid. 4. prosinec 2014]. ISSN 1745-6215. Dostupné z: doi:10.1186/1745-6215-9-37
 203. Savitz S.I., Dinsmore J., Wu J., Henderson G.V., Stieg P. a Caplan L.R., 2005. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)* [online]. roč. 20, č. 2, s. 101–107. ISSN 1015-9770. Dostupné z: doi:10.1159/000086518
 204. Segi-Nishida E., Warner-Schmidt J.L. a Duman R.S., 2008. Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 12.8., roč. 105, č. 32, s. 11352–11357. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0710858105

205. Selmani Z., Naji A., Zidi I., Favier B., Gaiffe E., Obert L., Borg C., Saas P., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., et al., 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* [online]. 1., roč. 26, č. 1, s. 212–222. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2007-0554
206. Selvaggi T.A., Walker R.E. a Fleisher T.A., 1997. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*. 1.2., roč. 89, č. 3, s. 776–779. ISSN 0006-4971.
207. Seminatore C., Polentes J., Ellman D., Kozubenko N., Itier V., Tine S., Tritschler L., Brenot M., Guidou E., Blondeau J., et al., 2010. The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* [online]. 1., roč. 41, č. 1, s. 153–159. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.109.563015
208. Sensebé L., Bourin P. a Tarte K., 2011. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human Gene Therapy* [online]. 1., roč. 22, č. 1, s. 19–26. ISSN 1557-7422. Dostupné z: doi:10.1089/hum.2010.197
209. Shahdadfar A., Frønsdal K., Haug T., Reinholt F.P. a Brinchmann J.E., 2005. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 10., roč. 23, č. 9, s. 1357–1366. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2005-0094
210. Shanskii Y.D., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirakozov M.S., Kirsanova V.A., Akhmedova S.A., Antokhin A.I. a Chissov V.I., 2013. Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 11., roč. 156, č. 1, s. 146–151. ISSN 1573-8221.
211. Shen C.-C., Yang Y.-C., Chiao M.-T., Cheng W.-Y., Tsuei Y.-S. a Ko J.-L., 2010. Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke. *Current neurovascular research*. 2., roč. 7, č. 1, s. 6–14. ISSN 1875-5739.
212. Shepherd P.G., Popplewell J. a Charles S.W., 1970. A method of producing ferrofluid with gadolinium particles. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 1.12., roč. 3, č. 12, s. 1985 [vid. 2. říjen 2014]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/3/12/430
213. Schmidtke-Schrezenmeier G., Urban M., Musyanovych A., Mailänder V., Rojewski M., Fekete N., Menard C., Deak E., Tarte K., Rasche V., et al., 2011. Labeling of mesenchymal stromal cells with iron oxide-poly(L-lactide) nanoparticles for magnetic resonance imaging: uptake, persistence, effects on cellular function and magnetic resonance imaging properties. *Cytotherapy* [online]. 9., roč. 13, č. 8, s. 962–975. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.3109/14653249.2011.571246
214. Schmits R., Filmus J., Gerwin N., Senaldi G., Kiefer F., Kundig T., Wakeham A., Shahinian A., Catzavelos C., Rak J., et al., 1997. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood*. 15.9., roč. 90, č. 6, s. 2217–2233. ISSN 0006-4971.
215. Schulz T.C., Noggle S.A., Palmarini G.M., Weiler D.A., Lyons I.G., Pensa K.A., Meedeniya A.C.B., Davidson B.P., Lambert N.A. a Condie B.G., 2004. Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells*

- (Dayton, Ohio) [online]. roč. 22, č. 7, s. 1218–1238. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2004-0114
216. Schumacher J.M., Ellias S.A., Palmer E.P., Kott H.S., Dinsmore J., Dempsey P.K., Fischman A.J., Thomas C., Feldman R.G., Kassissieh S., et al., 2000. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*. 14.3., roč. 54, č. 5, s. 1042–1050. ISSN 0028-3878.
 217. Silva A.C., Oliveira T.R., Mamani J.B., Malheiros S.M.F., Malavolta L., Pavon L.F., Sibov T.T., Amaro E. Jr, Tannús A., Vidoto E.L.G., et al., 2011. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *International journal of nanomedicine* [online]. roč. 6, s. 591–603. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S14737
 218. Soukup T., 2007. Dental pulp stem cells:phenotypis changes according to culture conditions. In: *Analytical cytometry IV*. Brno.
 219. Spaggiari G.M., Abdelrazik H., Becchetti F. a Moretta L., 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* [online]. 25.6., roč. 113, č. 26, s. 6576–6583. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-02-203943
 220. Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C. a Moretta L., 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* [online]. 1.2., roč. 111, č. 3, s. 1327–1333 [vid. 26. srpen 2014]. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2007-02-074997
 221. Stagg J. a Galipeau J., 2013. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Current molecular medicine*. 6., roč. 13, č. 5, s. 856–867. ISSN 1875-5666.
 222. Stemgent, 2014. *Stemgent* [online] [vid. 20. listopad 2012]. Dostupné z: <https://www.stemgent.com/>
 223. Stute N., Holtz K., Bubenheim M., Lange C., Blake F. a Zander A.R., 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology* [online]. 12., roč. 32, č. 12, s. 1212–1225. ISSN 0301-472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2004.09.003
 224. SÚKL, 2015. *Databáze klinických hodnocení, Státní ústav pro kontrolu léčiv*. 2015.
 225. Sun X., Zhang Q.-W., Xu M., Guo J.-J., Shen S.-W., Wang Y.-Q. a Sun F.-Y., 2012. New striatal neurons form projections to substantia nigra in adult rat brain after stroke. *Neurobiology of Disease* [online]. 1., roč. 45, č. 1, s. 601–609. ISSN 1095-953X. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2011.09.018
 226. Sutter R., Yadirgi G. a Marino S., 2007. Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships? *Biochimica et biophysica acta* [online]. 12., roč. 1776, č. 2, s. 125–137. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.006
 227. Školoudík D., 2014. Rekanalizační léčba mozkové ischemie – jak dál? *Neurologie pro praxi*. roč. 2014, č. 15 (3), s. 125–130. ISSN ISSN - 1803-5280.

228. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. a Yamanaka S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* [online]. 30.11., roč. 131, č. 5, s. 861–872. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
229. Takahashi K. a Yamanaka S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* [online]. 25.8., roč. 126, č. 4, s. 663–676. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
230. Takao S., Ding Q. a Matsubara S., 2012. Pancreatic cancer stem cells: regulatory networks in the tumor microenvironment and targeted therapy. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* [online]. 11., roč. 19, č. 6, s. 614–620. ISSN 1868-6982. Dostupné z: doi:10.1007/s00534-012-0547-1
231. Tamariz E., Díaz-Martínez N.E., Díaz N.F., García-Peña C.M., Velasco I. a Varela-Echavarría A., 2010. Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 4., roč. 88, č. 5, s. 971–980. ISSN 1097-4547. Dostupné z: doi:10.1002/jnr.22268
232. Tamura A., Kirino T., Sano K., Takagi K. a Oka H., 1990. Atrophy of the ipsilateral substantia nigra following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Research*. 26.2., roč. 510, č. 1, s. 154–157. ISSN 0006-8993.
233. Tang C., Ang B.T. a Pervaiz S., 2007. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 12., roč. 21, č. 14, s. 3777–3785. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.07-8560rev
234. Tárnok A., Ulrich H. a Bocsi J., 2010. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* [online]. 1., roč. 77, č. 1, s. 6–10. ISSN 1552-4930. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20844
235. Tartaj P., González-Carreño T. a Serna C.J., 2001. Single-Step Nanoengineering of Silica Coated Maghemite Hollow Spheres with Tunable Magnetic Properties. *Advanced Materials* [online]. 1.11., roč. 13, č. 21, s. 1620–1624 [vid. 2. říjen 2014]. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/1521-4095(200111)13:21<1620::AID-ADMA1620>3.0.CO;2-Z
236. Tasso R., Ilengo C., Quarto R., Cancedda R., Caspi R.R. a Pennesi G., 2012. Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science* [online]. 2., roč. 53, č. 2, s. 786–793. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.11-8211
237. Tatlisumak T. a Fisher M., 2006. *Handbook of experimental neurology*. B.m.: Cambridge University Press.
238. Tekkotte C., Vidyasekar P., Kapadia N.K. a Verma R.S., 2012. Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. *Cell and Tissue Research* [online]. 2., roč. 347, č. 2, s. 383–395. ISSN 1432-0878. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-012-1328-5
239. Tekle W.G., Adkinson C.D., Chaudhry S.A., Jadhav V., Hassan A.E., Rodriguez G.J. a Qureshi A.I., 2012. Factors Associated with Favorable Response to Hyperbaric Oxygen Therapy among Patients Presenting with Iatrogenic Cerebral Arterial Gas Embolism. *Neurocritical care* [online]. 7.3. ISSN 1556-0961. Dostupné z: doi:10.1007/s12028-012-9683-3

240. Templin C., Kränkel N., Lüscher T.F. a Landmesser U., 2011. Stem cells in cardiovascular regeneration: from preservation of endogenous repair to future cardiovascular therapies. *Current pharmaceutical design*. 10., roč. 17, č. 30, s. 3280–3294. ISSN 1873-4286.
241. Teng Z., Yoshida T., Okabe M., Toda A., Higuchi O., Nogami M., Yoneda N., Zhou K., Kyo S., Kiyono T., et al., 2013. Establishment of Immortalized Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation* [online]. roč. 22, č. 2, s. 267–278. Dostupné z: doi:10.3727/096368912X655055
242. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. a Jones J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*. 6.11., roč. 282, č. 5391, s. 1145–1147. ISSN 0036-8075.
243. Tingling J.D., Bake S., Holgate R., Rawlings J., Nagsuk P.P., Chandrasekharan J., Schneider S.L. a Miranda R.C., 2013. CD24 expression identifies teratogen-sensitive fetal neural stem cell subpopulations: evidence from developmental ethanol exposure and orthotopic cell transfer models. *PloS One* [online]. roč. 8, č. 7, s. e69560. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0069560
244. Tropea K.A., Leder E., Aslam M., Lau A.N., Raiser D.M., Lee J.-H., Balasubramaniam V., Fredenburgh L.E., Alex Mitsialis S., Kourembanas S., et al., 2012. Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* [online]. 1.5., roč. 302, č. 9, s. L829–837. ISSN 1522-1504. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00347.2011
245. Turnovcova K., Ruzickova K., Vanecek V., Sykova E. a Jendelova P., 2009. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy* [online]. roč. 11, č. 7, s. 874–885. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.3109/14653240903188947
246. Tuttolomondo A., Di Sciacca R., Di Raimondo D., Renda C., Pinto A. a Licata G., 2009. Inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke treatment. *Current topics in medicinal chemistry*. roč. 9, č. 14, s. 1240–1260. ISSN 1873-4294.
247. Urdziková L., Jendelová P., Glogarová K., Burian M., Hájek M. a Syková E., 2006. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma* [online]. 9., roč. 23, č. 9, s. 1379–1391. ISSN 0897-7151. Dostupné z: doi:10.1089/neu.2006.23.1379
248. Urdziková L., Likavčanová-Mašínová K., Vaněček V., Růžička J., Sedý J., Syková E. a Jendelová P., 2011. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-colony-stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy* [online]. 10., roč. 13, č. 9, s. 1090–1104. ISSN 1477-2566. Dostupné z: doi:10.3109/14653249.2011.575355
249. ÚZIS ČR, 2012. *Hospitalizovaní a zemřelí na cévní nemoci mozku v ČR, v letech 2003–2010* [online]. 20. březen 2012. B.m.: ÚZIS ČR. Dostupné z: www.uzis.cz/system/files/03_12.pdf
250. Vallier L., 2011. Serum-free and feeder-free culture conditions for human embryonic stem cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. roč. 690, s. 57–66. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-962-8_3

251. Van Buul G.M., Koevoet W.L.M., Kops N., Bos P.K., Verhaar J.A.N., Weinans H., Bernsen M.R. a van Osch G.J.V.M., 2011. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *The American Journal of Sports Medicine* [online]. 11., roč. 39, č. 11, s. 2362–2370. ISSN 1552-3365. Dostupné z: doi:10.1177/0363546511419278
252. Van de Geijn G.-J.M., Hersmus R. a Looijenga L.H.J., 2009. Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews* [online]. 3., roč. 87, č. 1, s. 96–113. ISSN 1542-9768. Dostupné z: doi:10.1002/bdrc.20140
253. Van den Berge S.A., van Strien M.E., Korecka J.A., Dijkstra A.A., Sluijs J.A., Kooijman L., Eggers R., De Filippis L., Vescovi A.L., Verhaagen J., et al., 2011. The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain: a journal of neurology* [online]. 11., roč. 134, č. Pt 11, s. 3249–3263. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awr256
254. Van Praag H., Kempermann G. a Gage F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* [online]. 3., roč. 2, č. 3, s. 266–270. ISSN 1097-6256. Dostupné z: doi:10.1038/6368
255. Vavříková E. a Vinšová J., 2008. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. roč. 2009, č. 103, s. 56–65.
256. Vetter A., Reinisch A., Strunk D., Kremser C., Hahn H.W., Huck C.W., Ostermann T., Leithner K. a Bernkop-Schnürch A., 2011. Thiolated polyacrylic acid-modified iron oxide nanoparticles for in vitro labeling and MRI of stem cells. *Journal of drug targeting* [online]. 8., roč. 19, č. 7, s. 562–572. ISSN 1029-2330. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2010.542243
257. Waberžinek G. a Krajičková D., 2004. *Základy speciální neurologie*. B.m.: Karolinum. ISBN 8024608030.
258. Wagers A.J., 2012. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell stem cell* [online]. 6.4., roč. 10, č. 4, s. 362–369. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2012.02.018
259. Wang-Fischer Y., 2009. *Manual of stroke models in rats* [online]. Boca Raton: CRC Press [vid. 19. listopad 2012]. ISBN 9781420009521 1420009524 9780849395789 084939578X. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=234533>
260. Wang J., Sakariassen P.Ø., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Røslund G., Thorsen F., Stühr L., et al., 2008. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* [online]. 15.2., roč. 122, č. 4, s. 761–768. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.23130
261. Wang L., Lin Z., Shao B., Zhuge Q. a Jin K., 2013. Therapeutic applications of bone marrow-derived stem cells in ischemic stroke. *Neurological Research* [online]. 6., roč. 35, č. 5, s. 470–478. ISSN 1743-1328. Dostupné z: doi:10.1179/1743132813Y.0000000210
262. Wang L., Shi J., van Ginkel F.W., Lan L., Niemeyer G., Martin D.R., Snyder E.Y. a Cox N.R., 2009. Neural stem/progenitor cells modulate immune responses by suppressing T lymphocytes with nitric oxide and prostaglandin E2. *Experimental Neurology* [online]. 3., roč. 216, č. 1, s. 177–183. ISSN 1090-2430. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2008.11.017

263. Watanabe T., Kawano Y., Kanamaru S., Onishi T., Kaneko S., Wakata Y., Nakagawa R., Makimoto A., Kuroda Y., Takaue Y., et al., 1999. Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood*. 15.2., roč. 93, č. 4, s. 1157–1163. ISSN 0006-4971.
264. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S. a Ginsberg M.D., 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of neurology* [online]. 5., roč. 17, č. 5, s. 497–504. ISSN 0364-5134. Dostupné z: doi:10.1002/ana.410170513
265. Weber G.F., Ashkar S., Glimcher M.J. a Cantor H., 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science (New York, N.Y.)*. 26.1., roč. 271, č. 5248, s. 509–512. ISSN 0036-8075.
266. Weis C., Blank F., West A., Black G., Woodward R.C., Carroll M.R.J., Mainka A., Kartmann R., Brandl A., Bruns H., et al., 2013. Labeling of cancer cells with magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 28.6. ISSN 1522-2594. Dostupné z: doi:10.1002/mrm.24832
267. WHO, 2012. WHO | Global Burden of Disease (GBD). *WHO* [online] [vid. 19. listopad 2012]. Dostupné z: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/
268. WHO, 2014. WHO | The top 10 causes of death. *WHO* [online] [vid. 28. leden 2014]. Dostupné z: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>
269. Victorin K., Clarke D.J., Bolam J.P., Brundin P., Gustavii B., Lindvall O. a Björklund A., 1990. Extensive efferent projections of intra-striatally transplanted striatal neurons as revealed by a species-specific neurofilament marker and anterograde axonal tracing. *Progress in Brain Research*. roč. 82, s. 391–399. ISSN 0079-6123.
270. Wijaya L., Agustina D., Lizandi A.O., Kartawinata M.M. a Sandra F., 2011. Reversing breast cancer stem cell into breast somatic stem cell. *Current pharmaceutical biotechnology*. 1.2., roč. 12, č. 2, s. 189–195. ISSN 1873-4316.
271. Wolf M.E., Szabo K., Griebel M., Förster A., Gass A., Hennerici M.G. a Kern R., 2011. Clinical and MRI characteristics of acute migrainous infarction. *Neurology* [online]. 31.5., roč. 76, č. 22, s. 1911–1917. ISSN 1526-632X. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0b013e31821d74d5
272. Worel N., Apperley J.F., Basak G.W., Douglas K.W., Gabriel I.H., Gerald C., Hübel K., Jaksic O., Koristek Z., Lanza F., et al., 2012. European data on stem cell mobilization with plerixafor in patients with nonhematologic diseases: an analysis of the European consortium of stem cell mobilization. *Transfusion* [online]. 11., roč. 52, č. 11, s. 2395–2400. ISSN 1537-2995. Dostupné z: doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03603.x
273. Wu X.-B. a Tao R., 2012. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPDI*. 15.8., roč. 11, č. 4, s. 360–371. ISSN 1499-3872.
274. Wu Y., Wang J., Scott P.G. a Tredget E.E., 2007. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. 10., roč. 15 Suppl 1, s. S18–26. ISSN 1067-1927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x

275. Xia H., Larska M., Giammarioli M., De Mia G.M., Cardeti G., Zhou W., Alenius S., Belák S. a Liu L., 2013. Genetic detection and characterization of atypical bovine pestiviruses in foetal bovine sera claimed to be of Australian origin. *Transboundary and Emerging Diseases* [online]. 6., roč. 60, č. 3, s. 284–288. ISSN 1865-1682. Dostupné z: doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01341.x
276. Xu Q., Zhang H.-T., Liu K., Rao J.-H., Liu X.-M., Wu L. a Xu B.-N., 2011. In vitro and in vivo magnetic resonance tracking of Sinerem-labeled human umbilical mesenchymal stromal cell-derived Schwann cells. *Cellular and molecular neurobiology* [online]. 4., roč. 31, č. 3, s. 365–375. ISSN 1573-6830. Dostupné z: doi:10.1007/s10571-010-9628-3
277. Yang C.-Y., Hsiao J.-K., Tai M.-F., Chen S.-T., Cheng H.-Y., Wang J.-L. a Liu H.-M., 2011. Direct labeling of hMSC with SPIO: the long-term influence on toxicity, chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging* [online]. 6., roč. 13, č. 3, s. 443–451. ISSN 1860-2002. Dostupné z: doi:10.1007/s11307-010-0360-7
278. Yang S., Edman L.C., Sánchez-Alcañiz J.A., Fritz N., Bonilla S., Hecht J., Uhlén P., Pleasure S.J., Villaescusa J.C., Marín O., et al., 2013. Cxcl12/Cxcr4 signaling controls the migration and process orientation of A9-A10 dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)* [online]. 11., roč. 140, č. 22, s. 4554–4564. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.098145
279. Yan J., Welsh A.M., Bora S.H., Snyder E.Y. a Koliatsos V.E., 2004. Differentiation and tropic/trophic effects of exogenous neural precursors in the adult spinal cord. *The Journal of comparative neurology* [online]. 29.11., roč. 480, č. 1, s. 101–114. ISSN 0021-9967. Dostupné z: doi:10.1002/cne.20344
280. Yan Y.-P., Lang B.T., Vemuganti R. a Dempsey R.J., 2009. Osteopontin is a mediator of the lateral migration of neuroblasts from the subventricular zone after focal cerebral ischemia. *Neurochemistry International* [online]. 12., roč. 55, č. 8, s. 826–832. ISSN 1872-9754. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2009.08.007
281. Yasuhara T., Matsukawa N., Hara K., Yu G., Xu L., Maki M., Kim S.U. a Borlongan C.V., 2006. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. 29.11., roč. 26, č. 48, s. 12497–12511. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3719-06.2006
282. Yoo S.-W., Kim S.-S., Lee S.-Y., Lee H.-S., Kim H.-S., Lee Y.-D. a Suh-Kim H., 2008. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Experimental & molecular medicine*. 31.8., roč. 40, č. 4, s. 387–397. ISSN 1226-3613.
283. Young H.E. a Black A.C., 2004. Adult stem cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* [online]. 1., roč. 276, č. 1, s. 75–102. ISSN 1552-4884. Dostupné z: doi:10.1002/ar.a.10134
284. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 21.12., roč. 318, č. 5858, s. 1917–1920. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1151526
285. Zhang W., Ge W., Li C., You S., Liao L., Han Q., Deng W. a Zhao R.C.H., 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-

- derived dendritic cells. *Stem Cells and Development* [online]. 6., roč. 13, č. 3, s. 263–271. ISSN 1547-3287. Dostupné z: doi:10.1089/154732804323099190
286. Zimmet H., Porapakham P., Porapakham P., Sata Y., Haas S.J., Itescu S., Forbes A. a Krum H., 2012. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *European journal of heart failure* [online]. 1., roč. 14, č. 1, s. 91–105. ISSN 1879-0844. Dostupné z: doi:10.1093/eurjhf/hfr148
287. Žižka J. a Válek V., 1996. *Moderní diagnostické metody: magnetická rezonance. III. díl.* B.m.: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 8070132256.

12. Publikace, které jsou podkladem práce

Analysis of In Vitro and In Vivo Characteristics of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors

Nataliya Kozubenko,*† Karolina Turnovcova,*† Miroslava Kapcalova,*†
Olena Butenko,* Miroslava Anderova,*† Vendula Rusnakova,‡ Míkael Kubista,‡§
Ales Hampl,*†¶ Pavla Jendelova,*† and Eva Sykova,*†

*Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

†Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair,
Charles University, Second Medical Faculty, Prague, Czech Republic

‡Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

§TATAA Biocenter, Lundberg Laboratory, Goteborg, Sweden

¶Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

During the last decade, much progress has been made in developing protocols for the differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) into a neural phenotype. The appropriate agent for cell therapy is neural precursors (NPs). Here, we demonstrate the derivation of highly enriched and expandable populations of proliferating NPs from the CCTL14 line of hESCs. These NPs could differentiate in vitro into functionally active neurons, as confirmed by immunohistochemical staining and electrophysiological analysis. Neural cells differentiated in vitro from hESCs exhibit broad cellular heterogeneity with respect to developmental stage and lineage specification. To analyze the population of the derived NPs, we used fluorescence-activated cell sorting (FACS) and characterized the expression of several pluripotent and neural markers, such as Nanog, SSEA-4, SSEA-1, TRA-1-60, CD24, CD133, CD56 (NCAM), β -III-tubulin, NF70, nestin, CD271 (NGFR), CD29, CD73, and CD105 during long-term propagation. The analyzed cells were used for transplantation into the injured rodent brain; the tumorigenicity of the transplanted cells was apparently eliminated following long-term culture. These results complete the characterization of the CCTL14 line of hESCs and provide a framework for developing cell selection strategies for neural cell-based therapies.

Key words: Human embryonic stem cells (hESCs); Neural differentiation; Fluorescent-activated cell sorting; RT-PCR; Transplantation

INTRODUCTION

Human embryonic stem cells (hESCs) are derived from the inner cell mass of preimplantation embryos and retain the developmental potency of embryonic founder cells. hESCs have the ability to differentiate into cells and tissues of all three germ layers in vitro and in vivo (44,51,58). During the last decade, great progress has been made by several teams in optimizing protocols for hESC differentiation into a neural phenotype. Recent studies have shown the differentiation of hESCs into the main neuronal and glial subtypes: DOPAergic (19,25, 46,56), GABAergic (13), and glutamatergic (20) neurons, astrocytes (11,24), and oligodendrocytes (11,38). However, the appropriate agent for cell therapy is neural precursors (NPs) because it is impossible to transplant

terminally differentiated cells. The high risk of tumor formation by NPs currently remains the greatest obstacle in using hESC-derived NPs for transplantation.

Thus, the question of the characterization and analysis of NP populations derived from hESCs remains open. Furthermore, there are currently no published data that provide a connection between the properties of this kind of cell in vitro and their behavior after transplantation in vivo: the ability to survive, proliferate, migrate, differentiate, maintain a neural phenotype, and/or form a tumor. We present a novel in vitro protocol for the efficient generation of hESC-derived NPs. Moreover, we show a correlation between the profile of pluripotent and neural marker expression as analyzed by flow cytometry and the elimination of the tumorigenicity of hESC-derived NPs in vivo after their long-term propaga-

Received December 22, 2008; final acceptance December 15, 2009. Online prepub date: December 18, 2009.

Address correspondence to Prof. Eva Sykova, Dr.Sc., Institute of Experimental Medicine, ASCR, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.
Tel: +420 241 062 230; Fax: +420 241 062 782; E-mail: sykova@biomed.cas.cz

tion in vitro. We also confirm the ability of NPs to differentiate into a neuronal phenotype and to develop into functionally active neurons in vitro.

MATERIALS AND METHODS

hESC Culture

The CCTL14 line of human ESCs was derived by the Department of Molecular Embryology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic. (Complete information on the derivation and characterization of hESCs is available at <http://www.isscr.org/science/sclines.htm>.) Cells were cultured on a feeder layer of mitomycin-C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in gelatin-coated tissue culture dishes. The culture medium (CM) was Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F-12 without L-glutamine) supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin at 50 U/ml (all from GIBCO, Rockville, MD), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 4 ng/ml human recombinant fibroblast growth factor (hrFGF) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Colonies of hESCs were passaged every 4–7 days using either mechanical scraping with a glass pipette to provide low-density cultures of undifferentiated cells or enzymatic dissociation with collagenase type IV (GIBCO) to provide high-density cultures of undifferentiated cells (Fig. 1, Stage 0).

Neural Progenitor Generation, Propagation, and Differentiation

To induce neural differentiation, clusters of undifferentiated hESC colonies were plated onto 0.1% agarose-

coated culture dishes containing CM. Initially, the cells were cultured for 4 days in CM without hrFGF (Fig. 1, Stage 1, 0–4d) and then the medium was supplemented with 500 ng/ml mouse recombinant noggin (mrNoggin) (R&D Systems, Minneapolis, MN) for another 4 days (Fig. 1, Stage 1, 4–8d). Half of the medium was replaced every other day. At this time, 70–90% of the colonies formed spherical bodies or embryoid bodies (EBs). Aggregates whose diameter exceeded 0.5 mm were dissected into smaller clumps with a 20-gauge surgical blade and then transferred into serum-free medium or NP medium (NPM). NPM consisted of DMEM/F12 (1:1), B27 supplement (1:50), 2 mM L-glutamine, and penicillin and streptomycin at 50 U/ml (GIBCO), supplemented with 20 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (hrEGF) (R&D Systems) and 20 ng/ml hrFGF. The cells were cultured for 6 days (Fig. 1, Stage 1, 8–14d). At this stage, cells in the EBs were defined as NPs passage 1 (P1).

For long-term propagation of hESC-derived NPs, the EBs were dissociated by accutase (Sigma-Aldrich) and the cells were plated onto laminin (Sigma-Aldrich)-coated culture dishes. Neural precursors were cultured in NPM and passaged by accutase each 5–7 days.

For terminal differentiation into a neuronal phenotype, the aggregates were dissociated by accutase and plated onto poly-D-lysine (PDL)/laminin-coated coverslips (Sigma-Aldrich). Plated cells were cultured in serum-free medium supplemented with B27 (1:50), 2 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin at 50 U/ml, 10 ng/ml hrFGF (Invitrogen), 10 ng/ml neurotrophin-3 (NT-3) (R&D Systems), 10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 1 ng/ml insulin-like growth fac-

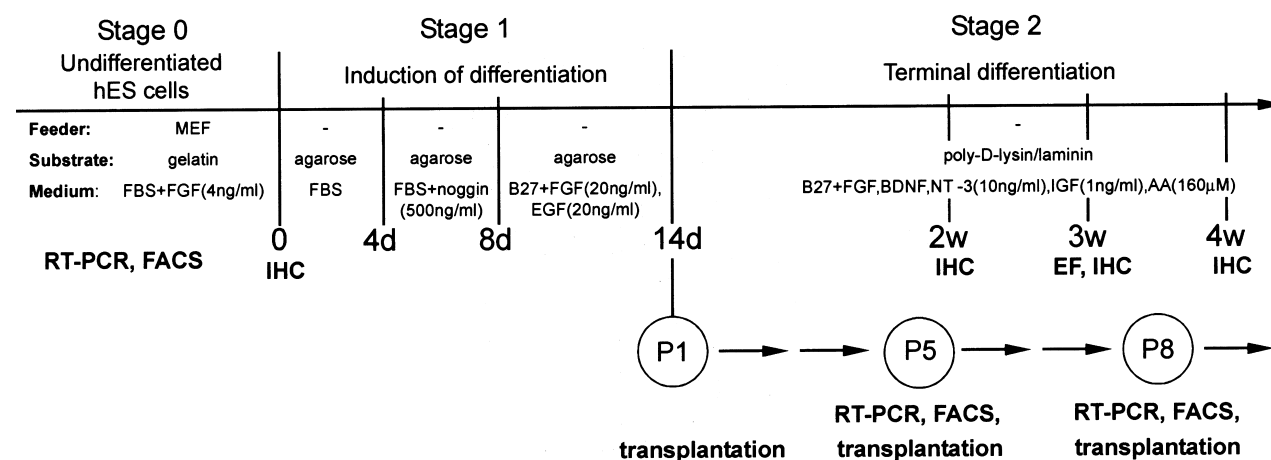


Figure 1. Schematic drawing of the in vitro differentiation protocol of hESCs into a neuronal phenotype. MEF, mouse embryonic fibroblasts; FBS, fetal bovine serum; FGF, fibroblast growth factor; EGF, epidermal growth factor; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; NT-3, neurotrophin-3; IGF-1, insulin-like growth factor-1; AA, ascorbic acid; IHC, immunohistochemical analysis; EF, electrophysiological investigation; FACS, fluorescence-activated cell sorting analysis; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

tor-1 (IGF-1), and 160 μ M ascorbic acid (AA) (all from Sigma-Aldrich) for 4 weeks (Fig. 1, Stage 2). The medium was replaced every other day. During the first 7 days of differentiation and weekly thereafter, a number of coverslips were chosen for immunocytochemical analysis.

To confirm the stability of the karyotype, the chromosome number and size were scored using G-banding before beginning the experiment.

Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis

The colonies of undifferentiated hESCs were detached from culture by collagenase type IV, centrifuged, and dissociated to a single cell suspension by accutase during 2 min. Neural precursors were dissociated from monolayers by accutase (Sigma-Aldrich) for 2–5 min. After rinsing with PBS, the cell suspension (10×10^6 cells/ml and no less than 3×10^5 cells per sample) was used for flow cytometric analysis using a Becton Dickinson FACSaria flow cytometer (BD Bioscience, San Diego, CA). Data analysis was performed using BD FACSDiVa software. To analyze the undifferentiated hESCs and hESC-derived NPs, conjugated antibodies against CD29, CD271 (neural growth factor receptor), HLA-ABC (BD Pharmingen, San Diego, CA), CD15 (SSEA-1), CD56 (neural cell adhesion molecule), CD24 (Exbio Antibodies, Prague, CR), CD133/1, CD133/2 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), Nanog, TRA-1-60, and SSEA-4 (eBioscience, San Diego, CA) were used, along with unconjugated primary antibodies against nestin and neurofilament 70 kDa (NF70) (produced in mouse, Abcam, Cambridge, UK) and a secondary rat anti-mouse IgM conjugated with FITC (eBioscience). As negative controls, IgG1 isotype conjugated with FITC or RPE and IgG2a isotype conjugated with RPE (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) were used, as well as rat anti-mouse IgM conjugated with FITC without the addition of the primary antibody.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Three parallel samples of undifferentiated hESCs and five parallel samples of hESC-derived NPs after five passages (P5) and eight passages (P8) were collected, washed with PBS buffer, and frozen at -70°C and stored. Total RNA was extracted using a RNeasy Micro kit (Qiagen). RNA concentrations were determined with the Nanodrop® ND1000 quantification system (Nanodrop Inc.), and RNA quality was assessed with the Experion system (BioRad) using the HighSense chip (BioRad). cDNA was synthesized using 200 ng of total RNA and 1.5 μ l of a mixture of 10 μ M 25-dT oligo and 10 μ M random hexamers (1:1). The mixture was incubated at 72°C for 10 min, then cooled to 4°C , and 100 U MMLV reverse transcriptase (Promega), 12 U RNasin

(Promega), and 5 nmol dNTPs were added to a total volume of 10 μ l and incubation continued at 37°C for 70 min. The reactions were subsequently diluted to 100 μ l and frozen.

Primers for nestin, Nanog, Oct4, Cripto, AFP, and Sox2 were used from the Truly Stem kit (TATAA Biocenter). Primers for SSEA-1, α -actin, VGEFR, Nodal, GATA4, and Prom1 (CD133) were designed using Primer3 software. Real-time PCR assays had a final volume of 20 μ l and contained 3 μ l of cDNA, 10 μ l of SYBRGreen JumpStart Taq ReadyMix for Quantitative PCR (Sigma), and 500 nM primers. PCR was performed using a CFX 96 (BioRad) with a cycling protocol of 95°C for 2 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 30 s. After cycling the melting curve was recorded between 95°C and 65°C .

Gene expression data were analyzed using Excel and GenEx software MultiD Analysis. Expression data were normalized to total RNA and corrected assuming a PCR efficiency of 95% for all genes. Each gene expression is presented relative to the average expression in the hESCs.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the differences between cell samples for real-time PCR was evaluated using a *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Antibodies and Immunocytochemistry

Cells plated onto poly-D-lysine/laminin-coated coverslips were washed in phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM, pH 7.2) and fixed with 4% paraformaldehyde or 0.25% glutaraldehyde in PBS for 30 min. Prior to immunostaining, the fixed cells were washed twice in PBS. Permeabilization and blocking were carried out in a blocking buffer consisting of 0.1% Triton, 5% goat serum, and 1 mg/ml bovine serum albumin in Tris buffer for 20 min. To identify undifferentiated hESCs, a Human Embryonic Stem Cell Marker Antibody Panel (R&D Systems) was used. To identify NPs and differentiated neurons, antibodies directed against synaptophysin (Chemicon, Temecula, CA), β -III-tubulin, neurofilament 160 kDa (NF-160), γ -aminobutyric acid (GABA), and glutamate (produced in mouse, Sigma-Aldrich) were used. To analyze proliferative activity of cells, antibodies directed against Ki67 (rabbit polyclonal, Abcam) were used. To visualize primary antibody reactivity, appropriate secondary antibodies were used: goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa-Fluor 488 and 594 and goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR).

After immunostaining, the coverslips with cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and examined using a

spectral confocal microscope (LEICA TCS SP) equipped with an Ar/HeNe laser or a ZEISS AXIO Observer.D1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

Quantitative analysis was carried out by counting the number of immunoreactive cells and comparing that number to the total number of viable cells as determined by DAPI staining. A minimum of 20 random fields were counted for each marker.

Middle Cerebral Artery Occlusion and Cell Transplantation

Adult male Sprague-Dawley rats weighing 280–350 g were used for experiments. Transient focal cerebral ischemia (90 min) was induced by intraluminal occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO) (17). Anesthesia was induced with isoflurane (Foran, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, UK) (5%) and maintained during surgery (2.5%) in an air mixture (1:2). After a midline incision at the neck, the right carotid bifurcation was exposed, and the common carotid artery (CCA) was occluded with a clamp while the external carotid artery branch was electrocoagulated distally. A nylon thread (0.08 mm diameter) with a terminal cylinder of silicon (3 mm length, 0.24 mm diameter) was inserted into the lumen of the external carotid artery and then gently advanced into the internal carotid artery up to the origin of the middle cerebral artery (MCA). After suture, animals were allowed to recover from anesthesia in their home cage. Ninety minutes later, the animals were reanesthetized for reperfusion: the clamp placed on the CCA as well as the nylon threads were gently removed. Shortly after surgery and daily during the following week, all animals received 1 ml of physiological saline intraperitoneally, in order to prevent postsurgical dehydration. The animals recovered from anesthesia and were placed back in their home cages.

Cell transplantation was carried out 7 days after the induction of ischemia. Using aseptic technique, a small hole was drilled into the skull above the lesion (0.5 mm anterior to bregma, 3 mm lateral to the midline). Neural precursors were dissociated from monolayers by accutase (Sigma-Aldrich) for 2–5 min, then 3 μ l of a cell suspension (100,000 cells/ μ l) were slowly injected over a 5-min period into the lesion using a Hamilton syringe with its tip placed 4.5–5 mm deep from the cortical surface. For immunosuppression, 10 mg/kg intraperitoneal Sandimmun (Novartis Pharama AG, Basel, Switzerland), 4 mg/kg intraperitoneal Immuran (GlaxoSmith-Kline, USA), and 2 mg/kg intramuscular Solu-Medrol (Pfizer, Puurs, Belgium) were administered each day.

Brain Slices, Staining, and Cell Quantification

Rats were sacrificed 1–3 months after transplantation. The anesthetized animals were perfused with 4%

paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). Fixed brains were dissected and immersed in PBS with 30% sucrose. Frozen coronal sections (40 μ m) were cut through the areas of interest. To identify NPs transplanted into the rat brain, antibodies directed against mitochondria (MTCO2), neuron-specific enolase (NSE), Ki67 (produced in mouse, abcam), human nuclei (HuNu), nestin (produced in mouse), and neural cell adhesion molecule (NCAM) (produced in rabbit) (Chemicon) were used. To visualize primary antibody reactivity, appropriate secondary antibodies were used: goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa-Fluor 488 and 594 and goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-Fluor 594 (Molecular Probes).

Cell numbers were assessed using an Olympus CAST-Grid system (Olympus). The surface areas in sections covered by grafted HuNu-positive cells were delineated. The total number of cells within the grafts was estimated by CAST software. The Ki67 index was calculated as the ratio of Ki67-positive cells to the total number of HuNu-positive cells.

Electrophysiology

Cell membrane currents were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration (16). Recording pipettes with a tip resistance of 6–8 M Ω were made from borosilicate capillaries (Rückl & Sons, Otovice, CR) using a Brown-Flaming micropipette puller (P-97, Sutter Instruments Company, Novato). Electrodes were filled with a solution containing (in mM): KCl 130.0, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2.0, EGTA 5.0, HEPES 10.0. The pH was adjusted with KOH to 7.2. For immunohistochemical identification after patch-clamp measurements, the recorded cells were filled with either Lucifer Yellow (LY) (Sigma-Aldrich) or Alexa-Fluor hydrazid 488 (Molecular Probes) by dialyzing the cytoplasm with the patch pipette solution. All recordings were carried out on cells perfused with artificial cerebrospinal fluid (ACF) at a temperature of 22–25°C. The ACF contained (in mM): NaCl 122.0, KCl 3.0, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.3, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 28.0, D-glucose 10.0. The pH was adjusted to 7.4 by gassing the ACF with 95% O₂/5% CO₂. Osmolarity was confirmed to be 300 \pm 10 mmol/kg with a vapor pressure osmometer (Vapro 5520, Wescor Inc., Logan).

The cells attached to PDL/laminin-coated coverslips were placed in a chamber mounted on the stage of a fluorescence microscope (Axioskop FX, Carl Zeiss). They were approached by the patch electrode using an INFRAPATCH system (Luigs&Neumann, Ratingen, Germany). The cells and the recording electrodes were imaged with a digital camera (Axiocam HRC, Carl Zeiss). Current signals were amplified with an EPC-10 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Ger-

many), low-pass filtered at 3 kHz, and sampled at 5 kHz by an interface connected to an AT-compatible computer system, which also served as a stimulus generator. Data acquisition, storage, and analysis were performed with PatchMaster/Fitmaster (HEKA Elektronik). Capacitance and series resistance were compensated (typically 60–80%). The liquid junction potential was adjusted according to previously published methods (4) using JPCalcW software.

After recording, the coverslips were fixed in phosphate buffer (0.2 M PB, pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde for 15 min and then transferred to PBS (10 mM, pH 7.2).

Resting membrane potential (V_{rest}) was measured by switching the EPC-10 amplifier to the current-clamp mode. The holding potential was -70 mV. Membrane capacitance (C_m) was determined automatically during acquisition by PatchMaster. Current patterns were obtained by clamping the cell membrane from a holding potential of either -70 or -50 mV to values ranging from -160 to $+40$ mV, at intervals of 10 mV. Pulse duration was 50 ms. In order to isolate voltage-gated delayed outwardly rectifying K^+ (K_{DR}) and inwardly rectifying K^+ (K_{IR}) current components, a voltage step from -70 to -60 mV was used to subtract the time- and voltage-independent passive currents as described previously (3,37). To activate only K_{DR} currents, the cells were held at -50 mV, and the amplitude of the K_{DR} current was measured at $+40$ mV at the end of the pulse. The A-type K^+ current component (K_A) was isolated by subtracting current traces clamped at -110 mV from those clamped at -70 mV, and its amplitude was measured at the peak value. The amplitudes of K_{IR} currents were measured at -160 mV at the end of the pulse. Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ currents were isolated by subtracting the current traces measured in $1 \mu\text{M}$ TTX-containing solution from those measured under control conditions. Na^+ current amplitudes were measured at the peak value. Action potential generation was carried out by switching the EPC-10 amplifier to current clamp mode and by injection of the current in increasing steps of 10 pA. Duration of each step was 500 ms.

Pharmacology of Voltage-Dependent K^+ and Na^+ Channels and Receptors

TTX ($1 \mu\text{M}$; Alomone Lab, Israel) was used to identify TTX-sensitive Na^+ channels. To identify voltage-dependent K_A and K_{DR} channels, 4-aminopyridine (4-AP; 2 mM) and tetraethylammonium (TEA; 10 mM) were used, while CsCl_2 (1 mM) was used to inhibit K_{IR} . To study the expression of functional ionotropic glutamergic or GABAergic receptors in differentiated cells, 100 μM glutamate, 50 μM GABA, and 50 μM bicuculline (all from Sigma) were used. Precise application of drugs

was achieved using a pressurized 8-channel perfusion system (AutoMate Scientific, Inc. Berkeley, CA). All reagents were diluted in ACF.

RESULTS

FACS Analysis of Undifferentiated hESCs

hESCs (CCTL14 line) were maintained on a layer of mouse embryonic fibroblasts, where they formed colonies of undifferentiated cells (Fig. 1, Stage 0). Genetic analysis showed that the cells had a normal 46,XX karyotype before beginning the experiment (data not shown). Immunohistochemical staining showed that undifferentiated hESCs expressed high levels of the pluripotent markers OCT-3/4 and Nanog, which are nuclear-localized transcription factors, and surface antigen SSEA-4. Single cells in the colonies were positive for SSEA-1. No positive staining for NCAM, NF70, nestin, or β -III-tubulin was found (data not shown).

To analyze the expression of several pluripotent and neuroectodermal markers in undifferentiated hESCs before starting the differentiation procedure, single cell suspensions were labeled with antibodies directed against Nanog, SSEA-4, SSEA-1, TRA-1-60, CD24, CD133, CD56 (NCAM), β -III-tubulin, NF70, nestin, CD271 (NGFR), CD29, and HLA-ABC (Table 1, Fig. 2). The expression profiles were categorized as follows, based on the percentage of positive cells: 0–5% negative, 6–39% low, 40–79% moderate, and 80–100% high. Flow cytometric analysis revealed high levels of Nanog and SSEA-4 expression, moderate levels of

Table 1. Comparative Analysis of the Expression of Pluripotent and Neural Markers in Undifferentiated hESCs and hESC-Derived Neural Precursors at Different Stages of Long-Term Propagation In Vitro

Marker	Undiff. hESCs	P5	P8	P10
Nanog	80.8	5.2	2.0	4.5
SSEA-4	91.0	3.3	2.5	16.5
SSEA-1	20.0	23.5	5.4	7.9
TRA-1-60	75.2	2.3	2.8	4.4
CD24	76.9	28.0	7.2	9.5
CD133	0.7	31.6	79.3	80.1
NCAM	0.5	99.3	97.9	92.2
β -III-tubulin	33.2	99.7	96.6	99.7
NF70	3.4	98.4	99.8	99.1
Nestin	11.2	99.8	97.6	99.7
CD271 (NGFR)	0.3	99.4	86.9	42.0
CD29	0.1	99.6	99.9	96.4
HLA-ABC	15.5	20.7	63.8	88.5

All results expressed as percentages of the whole population: 0–5%, negative reaction; 6–39%, low level of marker expression; 40–79%, moderate level of marker expression; 80–100%, high level of marker expression.

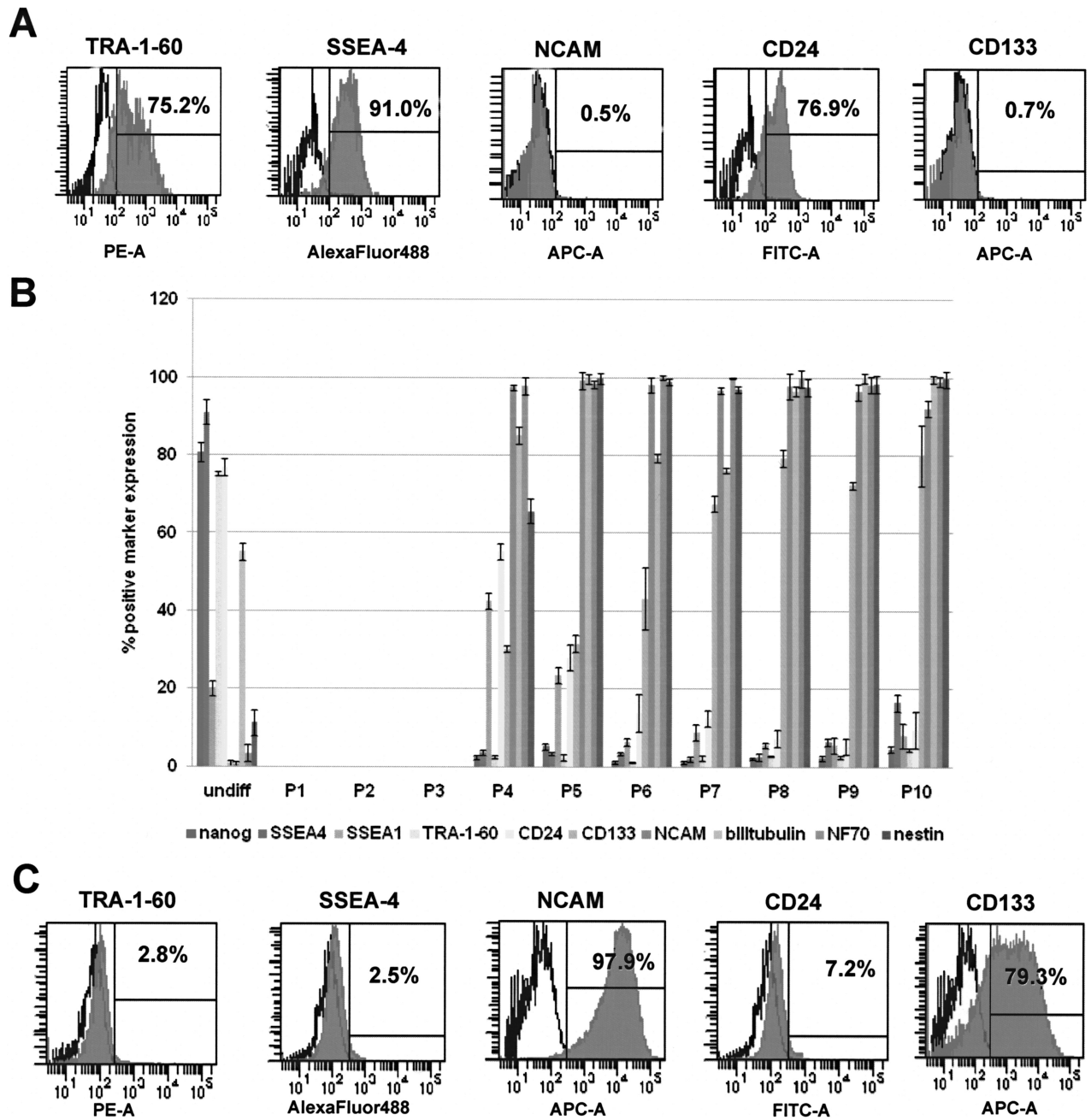


Figure 2. Fluorescence-activated cell sorting profiles of pluripotent and neural markers in undifferentiated hESCs and hESC-derived NPs during long-term propagation in vitro. (A) FACS profile of pluripotent and neural markers present in undifferentiated hESCs. (B) Comparative analysis of pluripotent and neural marker expression in undifferentiated hESCs and in hESC-derived NPs (P4–P10). (C) FACS profile of pluripotent and neural markers present in P8 NPs.

TRA-1-60, CD24, and β -III-tubulin expression, and low levels of SSEA-1, nestin, and HLA-ABC expression. Undifferentiated hESCs were negative for several neuroectodermal markers: CD133, NCAM, NF70, NGFR, and CD29. Overall, this analysis showed that the undifferentiated cells were positive for several pluripotent markers and did not express typical neural markers.

Derivation of Neural Precursors From hESCs and Their Propagation In Vitro

In this study, we used the CCT14 line of hESCs, the differentiation characteristics of which have not been previously described. To induce neuroectodermal differentiation, clumps of hESC colonies were scrubbed and

cultured under nonadherent conditions in suspension culture in hESC culture medium. During the first 4 days, the medium did not contain any mitogen or growth factor (Fig. 1, Stage 1, 0–4d), while for the next 4 days the medium was supplemented with mouse *nrNoggin* (Fig. 1, Stage 1, 4–8d), which suppresses nonneural differentiation and facilitates the production of a highly enriched population of NPs (20). Under these conditions, clusters formed tightly packed spherical structures called embryoid bodies (EBs). For another 6 days (Fig. 1, Stage 1, 8–14d), EBs were cultured in NP medium: serum-free medium supplemented with B27, hrFGF (20 ng/ml), and hrEGF (20 ng/ml). Such a growth factor combination is known to be effective for the propagation of human fetal- and adult-derived neuroectodermal progenitors (50,52) and facilitated the sequential propagation and expansion of the sphere cultures. After these 6 days (a total of 14 days after starting the induction of differentiation) cells in the EB culture were defined as hESC-derived NPs passage 1 (Fig. 1, 14d, P1). Further expansion of NPs (P1–P10) was performed in a monolayer on laminin-coated 6-cm petri dishes in NPM (Fig. 1, P1–P8 and later). Between two passages the number of cells increased 2.5–3.5-fold, and the period between passages increased from 3–4 to 5–7 days during P1–P10. NPs that had been frozen and stored in liquid nitrogen for 2–12 months survived well after thawing and plating them on laminin-coated dishes, and their proliferative activity did not change (data not shown). The karyotype of the cells was normal throughout the entire period of the experiment (from undifferentiated hESC to P10 hESC-derived NPs).

FACS Analysis of hESC-Derived Neural Precursors During Their Propagation In Vitro

To monitor the expression of pluripotent and neural markers in hESC-derived NPs during their long-term propagation in vitro and then to correlate the expression profile with the behavior of these cells in vivo, a series of FACS analyses was performed. From P4 to P10, cell suspensions were labeled with the same antibodies as used with undifferentiated hESCs, directed against: SSEA-4, SSEA-1, TRA-1-60, CD24, CD133, CD56 (NCAM), β -III-tubulin, NF70, nestin, CD271 (NGFR), and CD29 (Table 1, Fig. 2). Flow cytometry results revealed that NPs were negative for TRA-1-60 and Nanog and had a high level (or a moderate level for P4) of expression of several neuroectodermal markers, NCAM, β -III-tubulin, NF70, nestin, and CD29, throughout the entire period of observation. NPs were negative for SSEA-4 from P4 to P8, but low-level expression of this marker was detected at P9–P10. The expression of SSEA-1 and CD24 decreased from a moderate to a low level at P4–P5 and then remained at the same low level

to the end of the experiment. A high level of CD271 expression was found from P4 to P8. From P8 to P10, CD271 expression decreased, which correlated with the decreasing proliferative activity of the NPs in vitro. HLA-ABC antigen expression steadily increased over time during the long-term propagation of hESC-derived NPs. The most interesting expression profile was that of CD133, one of the controversial markers of NPs. We found that CD133 expression increased from low to moderate levels from P4 to P9, eventually reaching a high level at P10.

Taken together, these data confirm that the derived population of cells consists of neuroectodermal precursors and demonstrate the decreased pluripotent marker expression and proliferative activity of hESC-derived NPs during their long-term propagation in vitro.

Expression Analysis by Real-Time RT-PCR

The expression of 12 genes (*Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, *nestin*, *Prom1*, *SSEA-1*, α -actin, *Cripto*, *VGEFR*, α -feto-protein, *Nodal*, and *GATA 4*) was measured in undifferentiated hESCs (Fig. 1, Stage 0) and in hESC-derived NPs from P5 and P8 (Fig. 1, P5, P8). Figure 3 shows the gene expression levels found in the NPs normalized to the average expression levels in undifferentiated hESC. Two different expression profiles were found. *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, α -actin, *Cripto*, *VGEFR*, and *GATA 4* genes were expressed mainly in undifferentiated cells, and during long-term propagation in vitro their expression rapidly decreased. This is in agreement with our earlier findings using several different hESC lines (39). *Nestin*, *Prom1* (CD133), *SSEA-1*, α -fetoprotein, and *Nodal* genes showed different expression patterns in undifferentiated hESCs as well as in hESC-derived NPs of both passages when compared to the patterns of *Sox2*, *Oct4*, and *Nanog* gene expression. *SSEA-1* expression decreased from P5 NPs to P8 NPs ($p = 0.007$, two-sided *t*-test replicate samples), while *Prom1* (CD133) expression increased ($p < 10^{-5}$). Both *nestin* and α -fetoprotein showed an almost significant decrease from P5 NPs to P8 NPs ($p = 0.055$ and $p = 0.07$, respectively). The expression of the *Nodal* gene did not significantly change from undifferentiated hESC to P8 NP.

These data demonstrate that as a result of the induction of neural differentiation, the expression of pluripotent (*Sox2*, *Oct4*, and *Nanog*), mesodermal (α -actin, *Cripto*, and *VGEFR*), and endodermal (*GATA4*) genes was markedly downregulated.

Transplantation of hESC-Derived NPs Into the Rat Brain

An increasing number of animal studies provide evidence that regenerative cell-based therapies can lead to functional recovery after stroke (8). To assess the sur-

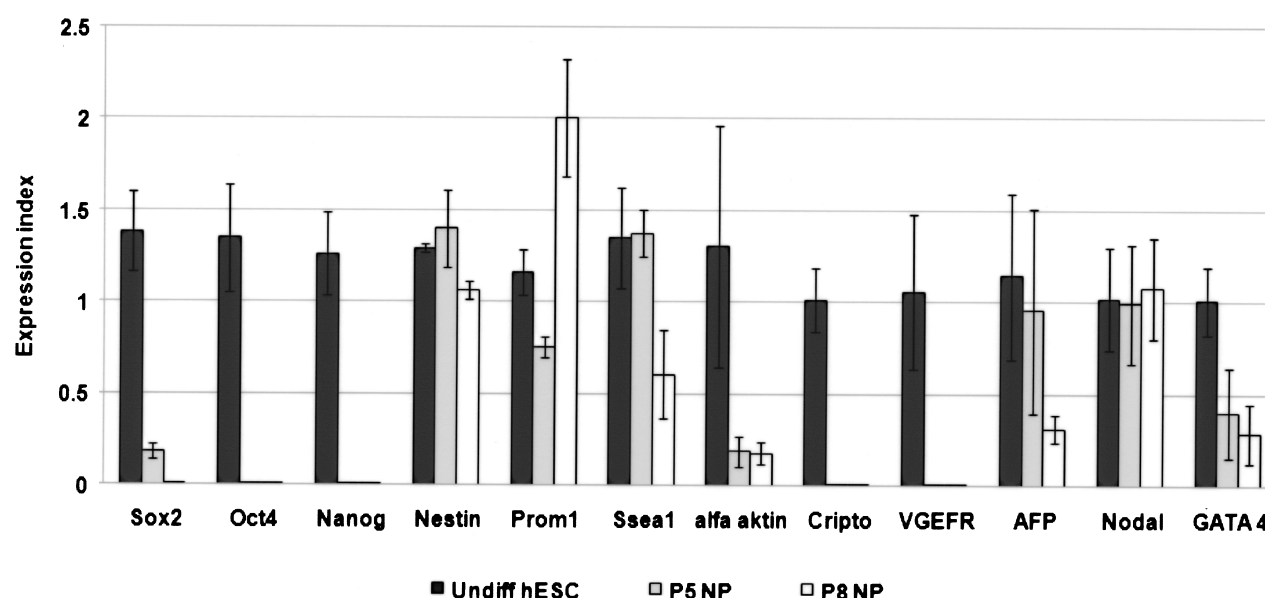


Figure 3. Expression analysis by real-time RT-PCR. Gene expression profiles of undifferentiated hESCs and hESC-derived neural precursors from passage 5 (P5) and passage 8 (P8).

vival and differentiation of hESC-derived NPs in vivo, we grafted them into the rat brain 7 days after a stroke induced by MCAO. Undifferentiated hESCs and NPs at different stages of their development (P1, P5, P8, and P10) were prepared in the form of single cell suspensions and were injected into the striatum of the lesioned hemisphere. In the grafts, cells were detected 2–12 weeks after transplantation by immunostaining for HuNu antigen.

In animals grafted with undifferentiated hESCs ($n = 12$), histological analysis revealed tumor formation at 2, 3, and 4 weeks after grafting (Table 2). Transplantation of P1 NPs ($n = 10$) gave the same results: tumors were found in 10 of 10 animals. The transplanted P5 NPs also survived for 4–6 weeks, but only in 5 of 11 grafts was tumor formation detected (i.e., a 50% decrease in the

tumorigenicity of the transplanted cells). Moreover, a migration of the grafted cells was noted in 2 of 10 animals that received P5 NPs. Rats ($n = 8$) implanted with P8 NPs were sacrificed at 8 or 12 weeks posttransplantation. We used staining for HuNu or MTCO2 to identify grafted cells. During this period no tumor formation was found, only one graft failed to survive, and in 5 of 7 recipients the migration of the grafted cells was detected (Fig. 4A and B). The majority of the migrating HuNu- or MTCO2-positive cells were costained for NCAM (Fig. 4C), nestin (Fig. 4E), and/or NSE (Fig. 4D). Some grafts contained cell numbers in the range of $400\text{--}600 \times 10^3$, exceeding the number of implanted cells and suggesting proliferation after grafting. The last group of animals was implanted with P10 NPs, and rats were sacrificed at 4, 8, or 12 weeks after transplantation. The survival of the grafted cells was much worse than in any of the other groups (only 5 of 8 grafts survived) and did not correlate with the length of time posttransplantation. A small number of grafted cells were found in brain sections; the cells did not form tumors and migrated poorly in 2 of the 8 recipients.

To evaluate the proliferative activity of P8 and P10 hESC NPs in vitro and in vivo (after grafting), the Ki67 index was calculated. For in vitro expanded P8 and P10 hESC NPs, the Ki67 index was $32.9 \pm 0.23\%$ and $16.2 \pm 0.24\%$, respectively. Eight weeks after transplantation, the number of Ki67-positive cells decreased to $25.1 \pm 0.26\%$ and $8.2 \pm 0.05\%$ for P8 and P10 NPs, respectively. By the 12th week after grafting, the number of

Table 2. Analysis of Several Series of hESC-Derived Neural Precursor Transplantation During Their Long-Term Propagation In Vitro

	Undiff. hESCs	P1	P5	P8	P10
Number of transplanted animals	12	10	11	8	8
Survival of grafts	12	10	10	7	5
Tumor formation	12	10	5	—	—
Cell migration towards the lesion site	—	—	2	5	2

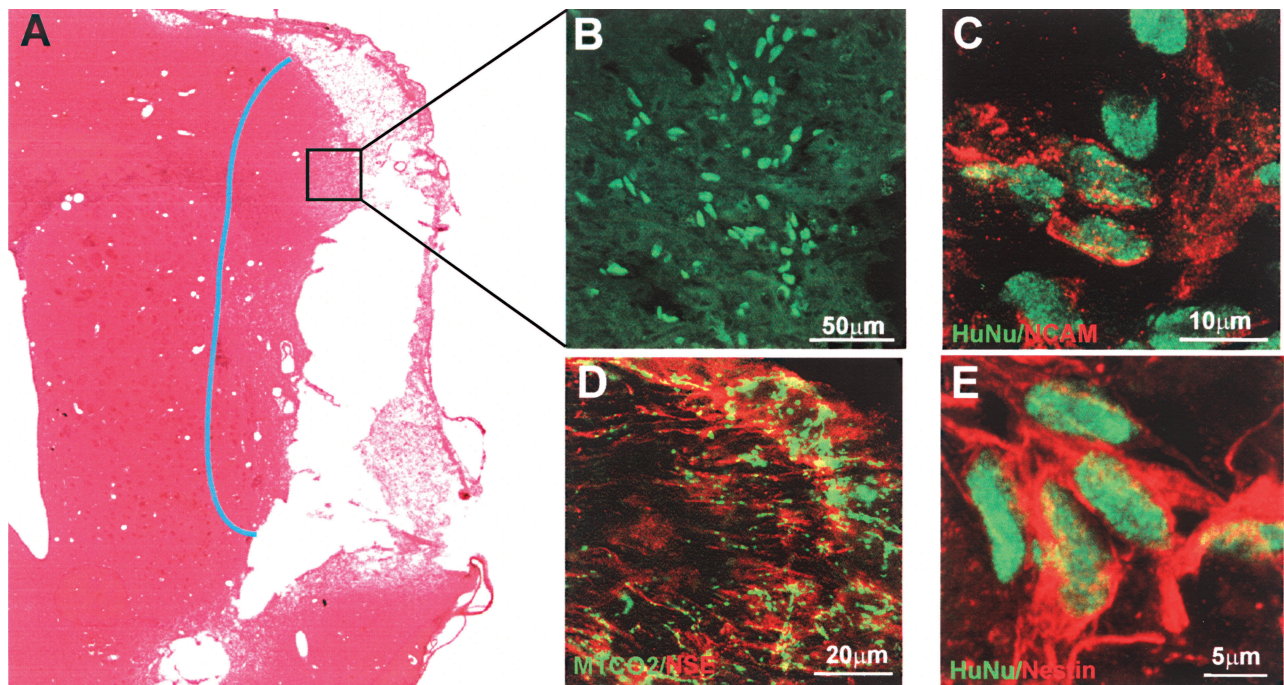


Figure 4. Immunohistochemical identification of hESC-derived neural precursors (P8) transplanted into the rat brain after the induction of a stroke. (A) Rat brain section 8 weeks after the transplantation of P8 NPs. The blue line shows the region of cell migration. (B) Immunohistochemical identification of human cells by HuNu and double-labeling for HuNu/NCAM (C), HuNu/Nestin (E), and MTCO2/NSE (D).

surviving P10 NP cells was very small; therefore, it was not possible to determine the Ki67 index. However, the number of Ki67-positive P8 NPs was found to be $12.2 \pm 0.04\%$. These data demonstrate that the proliferative activity of both groups of cells significantly decreased during the postengraftment period. Taken together, the analysis of the Ki67 index and the fact that the total number of grafted cells increased after transplantation suggest that even this low level of proliferative activity was enough to maintain a positive balance between cell proliferation/death and to ensure the good survival of the grafts in the case of P8 NPs.

Summarizing the results of cell transplantation, we suggest that hESC-derived NPs lose the capacity to form tumors after 7 passages in vitro while acquiring the ability to migrate, in most cases, to the lesioned brain tissue. Longer term propagation of cells in culture (P10), however, decreases the survival of the grafts and the ability of the cells to migrate towards the lesion site.

In Vitro Differentiation of hESC-Derived NPs Into a Neuronal Phenotype

To confirm the ability of hESC-derived NPs to give rise to functional neurons, terminal differentiation in vitro was induced (Fig. 1, Stage 2). EBs (P1) were dissociated using accutase and plated onto PDL/laminin-

coated coverslips at a density of 100,000 cells/ml. During the next 4 weeks, NPs were cultured in a medium containing 10 ng/ml hrFGF, 10 ng/ml NT-3, 10 ng/ml BDNF, 1 ng/ml IGF-I, and 160 μM AA. Within a few days after plating, most cells developed small processes. After only 2 weeks (Fig. 1, Stage 2, 2w), differentiating NPs showed the polar morphology of immature neurons: a spherical cell body with two long processes. Immunocytochemical analysis revealed that the majority of cells with the morphology of immature neurons were β -III-tubulin positive (Fig. 5A), while a few of them expressed low-molecular-weight neurofilaments, NF70 (Fig. 5B). From 15 days on, the cell processes had formed prominent fiber bundles and, frequently, small migrating cells were seen in close association with the fibers. Immunostaining for β -III-tubulin 3 weeks after plating (Fig. 1, Stage 2, 3w) revealed that the main portion of the differentiating cells were immature neurons (Fig. 5C). The fiber bundles were positive for synaptophysin (Fig. 5G) and for high-molecular-weight neurofilaments, NF160 (Fig. 5E), as well as for β -III-tubulin (Fig. 5B). The lower layer of the differentiating culture was populated by cells expressing glial precursor markers such as NG2 and S100 β ; some of these cells were positive for β -III-tubulin (data not shown) and evidently played the role of feeders for the terminally differentiat-

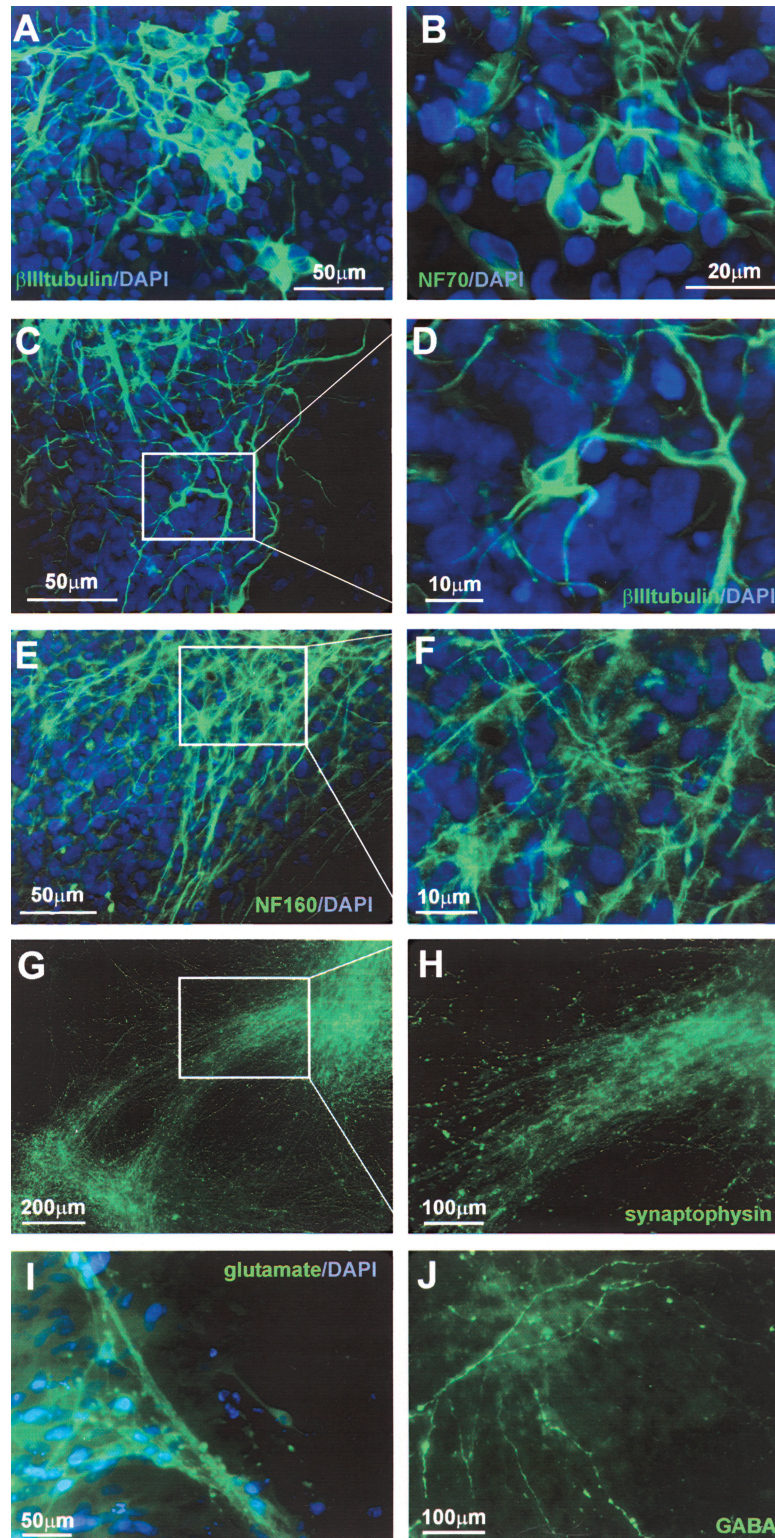


Figure 5. Immunocytochemical characterization of differentiating hESC-derived neurons. Immunostaining for β -III-tubulin (A) and NF70 (B) at stage 2 (2 weeks). Immunostaining for β -III-tubulin (C), NF160 (E), and synaptophysin (G) at stage 2 (3 weeks). (D, F, H) Higher magnification views of details of the staining shown in (C), (E), (G), respectively. (C) Immunostaining for glutamate (I) and GABA (J) at stage 2 (4 weeks).

ing cells. At this time point, several coverslips were chosen for electrophysiological investigation. By the fourth week after plating (Fig. 1, Stage 2, 4w), the culture of hESC-derived neurons contained cells expressing neurotransmitters such as glutamate (Fig. 5I) and GABA (Fig. 5J). The main volume of the culture was populated by neurons positive for synaptophysin and NF160 (data not shown). These results show that NPs derived from the hESC CCTL14 line are able to differentiate into neurons in vitro under defined culture conditions.

Quantitative analysis revealed that after in vitro differentiation, P1 hESC NP cultures contained $68.5 \pm 1.12\%$ β -III-tubulin-positive cells/total cells, $15.2 \pm 0.91\%$ NG2-positive cells/total cells, $20.4 \pm 0.25\%$ S100 β -positive cells/total cells, and $0.5 \pm 0.002\%$ glutamate-positive cells/total cells.

To determine the influence of long-term storage and the freeze-thaw cycle on differentiation potential, we performed terminal differentiation of P8 NPs, using the same protocol as described for P1 NPs. By the fourth week after the start of differentiation, quantitative analysis of the cultures revealed $42.4 \pm 1.03\%$ β -III-tubulin-positive cells/total cells, $20.1 \pm 0.81\%$ NG2-positive cells/total cells, $38.2 \pm 0.15\%$ S100 β -positive cells/total cells, and $0.1 \pm 0.001\%$ glutamate-positive cells/total cells. These data demonstrate that after prolonged maintenance in culture, hESC NPs retained their differentiation potential, but the percentage of neurons (β -III-tubulin-positive cells) decreased with a parallel increase of glial cells (NG2- and S100 β -positive cells).

Electrophysiological Investigation of hESC-Derived Neurons

The electrophysiological analysis of differentiated hESCs was carried out using the patch-clamp method in the whole cell configuration, 3 weeks after plating the cells on PDL/laminin-coated coverslips (Fig. 1, Stage 2, 3w). After 3 weeks a large number of β -III-tubulin-positive cells was detected (Fig. 6A). Initially, the recordings were performed in voltage-clamp mode to determine whether differentiated hESCs express some voltage-activated K^+ and Na^+ channels. Voltage steps from a holding potential of -70 mV to a range of test potentials between -160 and $+40$ mV (10-mV increments; 50-ms duration) were employed. We found that the β -III-tubulin-positive cells displayed outwardly rectifying K^+ currents, including fast activating and inactivating A-type (K_A) and delayed outwardly rectifying currents (K_{DR}) (Fig. 6B) sensitive to 2 mM 4-AP and 10 mM TEA. Moreover, they expressed TTX-sensitive Na^+ currents (I_{Na}) (Fig. 6C). The following membrane parameters of β -III-tubulin-positive cells ($n = 37$) are summarized in Table 3: resting membrane potential (V_{rest}), input resistance (I_R), membrane capacitance (C_m), and K_{DR} , K_A , and I_{Na} current

densities. Among a total of 37 β -III-tubulin-positive cells, the application of 100 μ M GABA elicited an inward current sensitive to bicuculline (Fig. 6D) in 12 of these cells, while no cell responded to 100 μ M glutamate. Besides β -III-tubulin-positive cells, we also found 4 cells displaying passive, symmetrical currents, but we were not able to identify them as either astrocytes or oligodendrocytes based on GFAP- or MOSP-positive staining. These cells were usually found in the layer beneath the β -III-tubulin-positive cells, and their number was negligible compared to those expressing a neuronal-like current pattern. Subsequently, recordings were performed in current-clamp mode to determine whether β -III-tubulin-positive cells could generate an action potential. In response to the injection of square current pulses (500-ms duration), 10 of 24 hESC-derived neurons fired trains of action potentials (Fig. 6E). The cells usually fired one to three action potentials in response to a sustained current injection with duration of ~ 10 ms.

These data demonstrate that 5 weeks after the induction of differentiation in vitro (Fig. 1. Stage 2, 3w), functional K_A , K_{DR} , and I_{Na} channels are present in hESC/ β -III-tubulin-positive cells and 32% of these cells express functional GABA $_A$ receptors. Moreover, 41% of cells are able to generate an action potential.

DISCUSSION

We demonstrate here the elimination of the tumorigenicity of hESC-derived NPs after long-term propagation in vitro. Transplantation of undifferentiated hESCs resulted in 100% graft survival and 100% tumor formation and/or hyperproliferation. In general, the cells were not able to migrate or incorporate into the host tissue, but rather showed invasive tumor growth. Based on immunostaining, RT-PCR, and FACS analysis, the population of undifferentiated hESCs is characterized by the high expression of typical markers of immature hESCs: Sox2, Oct4, Nanog, SSEA-4, and TRA-1-60. Interestingly, a low level of SSEA-1, nestin, and β -III-tubulin expression was shown by FACS. Moreover, RT-PCR revealed that the expression of the SSEA-1 and nestin genes was similar to that of Sox2, Oct 4, and Nanog. SSEA-1 is a typical marker for mouse ESCs, but it was shown by Adewumi and coworkers (1) that 20–30% of hESC lines can be positive for SSEA-1. While nestin and β -III-tubulin are among the early neuroectodermal markers, the expression of these molecules in undifferentiated hESCs was not demonstrated in our experiments by immunohistochemistry, a result that can be explained by the relatively low sensitivity of this method compared to FACS and RT-PCR.

Our results showed a 50% decrease in tumor formation after the transplantation of P5 NPs, compared to undifferentiated hESCs and P1 NPs. Graft survival was

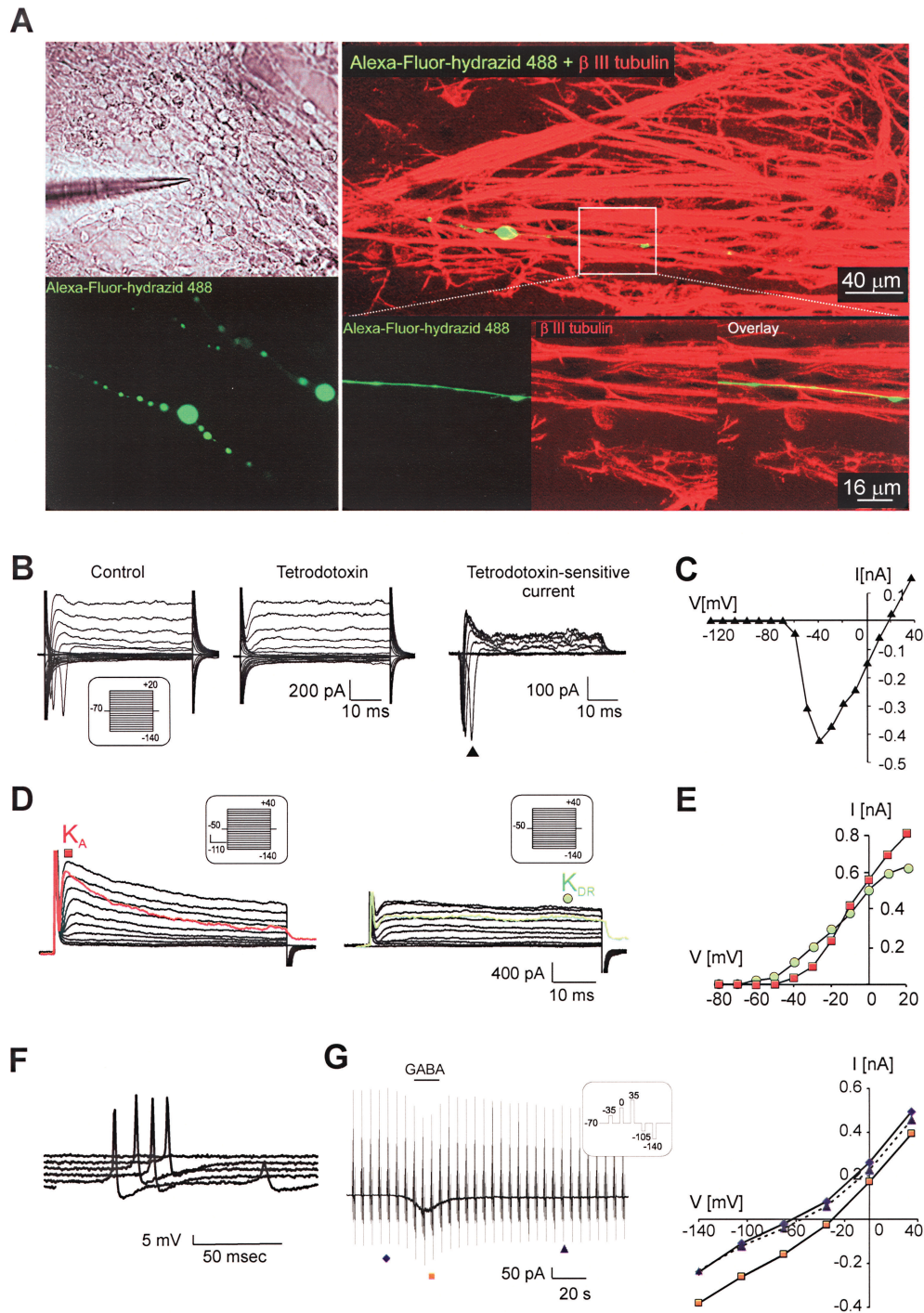


Figure 6. hESC-derived neural precursors express a typical neuronal current pattern in vitro. (A) Cell labeled with Alexa-Fluor-hydrazid-488 during patch-clamp recording (left) and its immunohistochemical identification (right). The upper photomicrograph demonstrates the typical morphology of hESC-derived neurons in vitro. Note the long bipolar processes. The higher magnification photomicrograph shows a detailed image of a β -III-tubulin-positive cell process. (B) Typical membrane current pattern of a β -III-tubulin-positive cell prior to (see the insets for voltage protocols) and after the application of 1 μ M tetrodotoxin and the tetrodotoxin-sensitive current. (C) The corresponding I/V relationship. (D) Fast activating A-type K^+ current (K_A , red color) and delayed outwardly rectifying K^+ current (K_{DR} , green color). (E) Corresponding I/V relationships for K_{DR} (filled circles) and K_A (filled squares). (F) Action potential generation by β -III-tubulin-positive cells demonstrated by representative voltage responses to an increasing current injection (in 10-pA steps). (G) GABA-evoked currents (left) and corresponding I/V relationships for control traces prior to (filled diamonds), during (filled squares), and after GABA washout (filled triangles, right).

Table 3. Membrane Properties of hESCs 5 Weeks After the Induction of Differentiation In Vitro (Fig. 1. Stage 2, 3w)

	Neuron-Like Current Pattern (<i>n</i> = 37 Cells)	Passive Symmetrical Current Pattern (<i>n</i> = 4 Cells)
V_{rest} (mV)	-58.2 ± 2.9	-81.6 ± 2.6
C_m (pF)	15.0 ± 1.9	30.5 ± 5.2
IR (M Ω)	561.4 ± 60.9	50.6 ± 5.7
K_{DR}/C_m (pA/pF)	37.7 ± 6.6	0
K_A/C_m (pA/pF)	93.9 ± 27.5	0
I_{Na}/C_m (pA/pF)	63.2 ± 21.9	0

V_{rest} , resting membrane potential; C_m , membrane capacitance; IR, input resistance; K_{DR}/C_m , K_A/C_m , and I_{Na}/C_m , K_{DR} , K_A , and I_{Na} current densities.

similar to the earlier groups (10 of 11 P5 grafts). The difference between these populations of cells consisted of the complete downregulation of the expression of the main pluripotent markers (Sox2, Oct4, Nanog, SSEA-4, and TRA-1-60) as well as mesodermal markers such as α -actin, Cripto, and VEGFR, a significant decrease of GATA4 gene expression and the strong upregulation of typical neuroectodermal markers (NCAM, β -III-tubulin, NF70, nestin, CD271, and CD29) in P5 NPs. However, such changes in pluripotent/neural marker expression do not provide enough safety from tumor formation, and thus the population of P5 NPs can still be dangerous for in vivo transplantation.

Transplantation of P8 NPs yielded the best results from among all the experimental groups; no tumor was found during 3 months of observation after transplantation, and in most grafts (5 of 7 recipients) the cells migrated towards the lesion. Immunohistochemical analysis revealed the costaining of transplanted cells for HuNu/nestin, HuNu/NCAM, and MTCO2/NSE, confirming that P8 NPs maintained a neural profile. It is unclear whether they could differentiate further to a mature neuronal phenotype because the observation period of 3 months is not sufficient for the terminal differentiation of hESC-derived NPs in vivo. The differences in the in vitro characteristics of the P8 NP population from the P5 NPs consist of a fourfold decrease in CD24 and SSEA-1 expression and a twofold increase in CD133 expression. According to several authors (7,41,43), the role of these three markers is critical in the process of differentiation of neural stem and progenitor cells. Mouse CD24 is expressed in vivo in the developing mouse brain and in the zone of secondary neurogenesis in adults (6), while in vitro this surface molecule appears in immature neurons and in a subpopulation of adult DRG neurons (47). Pruszek and coworkers (43) suggested that the expression of CD24 is upregulated during

neural differentiation. In contrast, our study shows that the expression of this marker in P8 NPs decreased almost 10-fold compared to that in undifferentiated hESCs. CD133 (prominin-1) is present in cells within neuroepithelial rosette-like structures, similar to the location of prominin-positive neuroepithelial cells during development (10,32). Moreover, CD133 has been shown to be one of the most reliable markers for human neural stem cells (hNSCs) (15). At the same time, CD133 was identified as a marker of glioblastoma stem-like cells (30,49). Our results demonstrate that upregulation of CD133 expression correlates with the elimination of the tumorigenicity of hESC-derived NPs. SSEA-1 (CD15) is not only a marker of embryonic stem cells, but its expression was demonstrated in human embryonic NSCs (27) and in mouse postnatal, adult, and embryonic NSCs (6,26,27). Here we demonstrate that a decrease in CD15 expression correlates with a decrease in the rate of tumor formation, confirming the suggestion of Gocht and coworkers (14) that in human gliomas, the staining intensity for CD15 inversely correlates with the grade of malignancy.

Taken together, our results show that the population of hESC-derived NPs that is appropriate and safe for in vivo use has a CD133^{hi}/CD24^{lo}/CD15^{lo} expression profile. However, because the role of these proteins in neurogenesis, the development of the human nervous system, and tumor formation is still unclear, further research into neural marker expression profiles should yield new insights relevant to future strategies for cell-mediated therapies.

The transplantation of P10 NPs was completely safe in terms of tumor formation, but the survival of the grafted cells was much lower (only 5 of 8 grafts survived). P10 NPs did not proliferate, and very weak migration was found in all grafts. Their surface marker expression profile did not reveal significant differences from that of P8 NPs, only the expression of CD271 was lower by 50% and the expression of HLA-ABC reached a high level (88.5%). CD271 (nerve growth factor receptor) is essential for normal development of the nervous system, because NGF promotes the survival and differentiation of sympathetic and sensory neurons during the embryonic development of peripheral neurons (5,18). In addition, during long-term propagation in vitro, the proliferative activity of hESC-derived NPs decreased significantly, especially between P8 and P10. As was shown by Li and colleagues (28), undifferentiated hESCs have immune-privilege properties, so that when injected into immunocompetent mice, hESCs are unable to induce an immune response. According to our results, the level of expression of HLA-ABC was similar for undifferentiated hESCs and for P5 NPs, but constantly decreased from P5 to P10. Evidently, the 88.5% positivity for HLA-ABC was critical for the survival of the grafted

cells. We suggest that increasing the immunogenicity of the NPs and decreasing their proliferative activity during long-term propagation in vitro resulted in poor survival, weak proliferation, and limited migration after transplantation in vivo.

It has been reported previously that the MCAO model generates an endogenous proliferation and migration response (29,48,57). According to our findings, endogenous neurogenesis was substantially activated and occurred close to the site of the lesion and diffusely throughout the entire right hemisphere of the ischemic rat brain. However, such activity was not morphologically and immunohistochemically colocalized with the grafted cells.

Finally, we have shown that hESC-derived NPs can differentiate in vitro into functional neurons. Since 1998, when J. Thomson first isolated human embryonic stem cells, great progress has been made in developing protocols for the neural differentiation of several lines of cells (45,46,56,58). Here we demonstrate the terminal differentiation of NPs derived from CCTL14 hESCs into a neuronal phenotype. As early as 2 weeks after plating and starting the terminal differentiation protocol, the cells were morphologically and immunohistologically characterized as immature neurons. During the next 2 weeks the maturation process of the neurons in vitro was revealed by electrophysiological recording as well as by immunohistochemical staining. Finally, by the fourth week of terminal differentiation, the differentiated neurons started to accumulate the neurotransmitters glutamate and GABA. Our hESC-derived NPs can be easily cryopreserved without losing their proliferative ability. However, long-term propagation in culture influences their differentiation potential. Terminal differentiation of P8 NPs revealed a lower percentage of neuronal and a higher percentage of glial cells compared to P1 NPs, which is in agreement with the findings of Itsykson et al. (20) and Erceg et al. (11).

Using whole-cell patch-clamp recordings, we have demonstrated that β -III-tubulin-positive cells displayed passive membrane properties in vitro that were within the range of mature neurons and expressed K_A , K_{DR} , and Na^+ currents, a typical neuronal current pattern. Their passive membrane properties, such as V_m , C_m , and I_R , and their K_A and K_{DR} current densities were similar to those previously published for hESCs (23,24,42). Despite the fact that the amplitudes of TTX-sensitive Na^+ currents in these cells were smaller than those of fully differentiated neurons (35), they were able to fire an action potential (AP). However, the AP duration in these cells was longer than that described by Johnson et al. (24), and also repetitive trains of action potentials were not observed. Because it has been shown that with progressing maturation the AP duration gets smaller and repetitive AP trains are more frequent, the longer AP dura-

tion and lack of repetitive AP trains observed in our cells might be due to a shorter period of differentiation. Furthermore, β -III-tubulin-positive cells expressed functional GABA_A receptors; however, they responded to GABA application with an inward current and cell membrane depolarization, a typical GABA action described in immature neocortical neurons (55), newly generated neurons in the adult brain (12), or neurons derived from embryonic NSCs in vitro (21,40,53,54). Depolarizing GABAergic transmission is required for the formation of glutamatergic synapses via GABA_ARs (2,31).

Using an immortalized NS/PC line, Jelita et al. (22) showed that despite the early presence of the NR1 and NR2A subunits, functional NMDA-gated channels appeared only later, in parallel with the formation of dense networks of neuronal processes. These authors also demonstrated that the appearance of NR2B protein in the membrane protein fraction showed a remarkable coincidence with the onset of receptor activity. Because the NR2B subunit protein has been proposed to be a limiting factor in the coassembly and cell surface targeting of the receptor (22,33,34), the lack of the mature form of NR2B protein might explain the lack of a response to glutamate in hNSCs. In addition, cultivating neural stem/progenitor cells in medium containing bFGF might cause a downregulation of mRNA for the NMDA receptor NR1 subunit as described in neurospheres (36). Furthermore, the NMDA receptors already present in the cell membrane can be affected by glycolysation and phosphorylation (9).

ACKNOWLEDGMENTS: We thank Radek Sindelka for contributing to the RT-PCR expression analysis and James Dutt for critical reading of the manuscript. Support was provided by grants AV0Z50390703 and AV0250520701 from the Academy of Sciences of the Czech Republic, grants IM0538 and LC554 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant IAA500520809 from the grant agency of the Academy of Science, 305/09/0717 and 309/08/H079 from the Grant Agency of the Czech Republic, the EC FP6 projects STEMS (LSHB-CT-2006-037328), and ENINET (LSHM-CT-2005-019063).

REFERENCES

1. Adewumi, O.; Aflatoonian, B.; Ahrlund-Richter, L.; Amit, M.; Andrews, P. W.; Beighton, G.; Bello, P. A.; Benvenisty, N.; Berry, L. S.; Bevan, S.; Blum, B.; Brooking, J.; Chen, K. G.; Choo, A. B.; Churchill, G. A.; Corbel, M.; Damjanov, I.; Draper, J. S.; Dvorak, P.; Emanuelsson, K.; Fleck, R. A.; Ford, A.; Gertow, K.; Gertsenstein, M.; Gokhale, P. J.; Hamilton, R. S.; Hampl, A.; Healy, L. E.; Hovatta, O.; Hyllner, J.; Imreh, M. P.; Itskovitz-Eldor, J.; Jackson, J.; Johnson, J. L.; Jones, M.; Kee, K.; King, B. L.; Knowles, B. B.; Lako, M.; Lebrin, F.; Mallon, B. S.; Manning, D.; Mayshar, Y.; McKay, R. D.; Michalska, A. E.; Mikkola, M.; Mileikovsky, M.; Minger, S. L.; Moore, H. D.; Mummery, C. L.; Nagy, A.; Nakatsuji, N.; O'Brien, C. M.; Oh, S. K.; Olsson, C.; Otonkoski, T.;

- Park, K. Y.; Passier, R.; Patel, H.; Patel, M.; Pedersen, R.; Pera, M. F.; Piekarczyk, M. S.; Pera, R. A.; Reubinoff, B. E.; Robins, A. J.; Rossant, J.; Rugg-Gunn, P.; Schulz, T. C.; Semb, H.; Sherrer, E. S.; Siemen, H.; Stacey, G. N.; Stojkovic, M.; Suemori, H.; Szatkiewicz, J.; Turetsky, T.; Tuuri, T.; van den Brink, S.; Vintersten, K.; Vuoristo, S.; Ward, D.; Weaver, T. A.; Young, L. A.; Zhang, W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25(7): 803–816; 2007.
2. Akerman, C. J.; Cline, H. T. Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing retinotectal circuit in vivo. *J. Neurosci.* 26(19):5117–5130; 2006.
3. Anderova, M.; Kubinova, S.; Jelitai, M.; Neprasova, H.; Glogarova, K.; Prajerova, I.; Urdzikova, L.; Chvatal, A.; Sykova, E. Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: Immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J. Neurobiol.* 66(10):1084–1100; 2006.
4. Barry, P. H. JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J. Neurosci. Methods* 51(1):107–116; 1994.
5. Brodie, C.; Gelfand, E. W. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J. Immunol.* 148(11):3492–3497; 1992.
6. Capela, A.; Temple, S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonpendymal. *Neuron* 35(5):865–875; 2002.
7. Carpenter, M. K.; Rosler, E. S.; Fisk, G. J.; Brandenberger, R.; Ares, X.; Miura, T.; Lucero, M.; Rao, M. S. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev. Dyn.* 229(2): 243–258; 2004.
8. Chang, Y. C.; Shyu, W. C.; Lin, S. Z.; Li, H. Regenerative therapy for stroke. *Cell Transplant.* 16(2):171–181; 2007.
9. Clark, R. A.; Gurd, J. W.; Bissoon, N.; Tricaud, N.; Molnar, E.; Zamze, S. E.; Dwek, R. A.; McIlhinney, R. A.; Wing, D. R. Identification of lectin-purified neural glycoproteins, GPs 180, 116, and 110, with NMDA and AMPA receptor subunits: Conservation of glycosylation at the synapse. *J. Neurochem.* 70(6):2594–2605; 1998.
10. Dubreuil, V.; Marzesco, A. M.; Corbeil, D.; Huttner, W. B.; Wilsch-Brauninger, M. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J. Cell. Biol.* 176(4):483–495; 2007.
11. Erceg, S.; Ronaghi, M.; Stojkovic, M. Human embryonic stem cell differentiation toward regional specific neural precursors. *Stem Cells* 27(1):78–87; 2009.
12. Ge, S.; Goh, E. L.; Sailor, K. A.; Kitabatake, Y.; Ming, G. L.; Song, H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439(7076):589–593; 2006.
13. Gerrard, L.; Rodgers, L.; Cui, W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells* 23(9):1234–1241; 2005.
14. Gocht, A.; Struckhoff, G.; Lhler, J. CD15-containing glycoconjugates in the central nervous system. *Histol. Histopathol.* 11(4):1007–1028; 1996.
15. Hall, P. E.; Lathia, J. D.; Miller, N. G.; Caldwell, M. A.; French-Constant, C. Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem Cells* 24(9):2078–2084; 2006.
16. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2):85–100; 1981.
17. Hara, H.; Huang, P. L.; Panahian, N.; Fishman, M. C.; Moskowitz, M. A. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16(4):605–611; 1996.
18. Hempstead, B. L.; Martin-Zanca, D.; Kaplan, D. R.; Parada, L. F.; Chao, M. V. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350(6320):678–683; 1991.
19. Hong, S.; Kang, U. J.; Isacson, O.; Kim, K. S. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 104(2):316–324; 2008.
20. Itsykson, P.; Ilouz, N.; Turetsky, T.; Goldstein, R. S.; Pera, M. F.; Fishbein, I.; Segal, M.; Reubinoff, B. E. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol. Cell. Neurosci.* 30(1):24–36; 2005.
21. Jelitai, M.; Anderova, M.; Marko, K.; Kekesi, K.; Koncz, P.; Sykova, E.; Madarasz, E. Role of gamma-aminobutyric acid in early neuronal development: Studies with an embryonic neuroectodermal stem cell clone. *J. Neurosci. Res.* 76(6):801–811; 2004.
22. Jelitai, M.; Schlett, K.; Varju, P.; Eisel, U.; Madarasz, E. Regulated appearance of NMDA receptor subunits and channel functions during in vitro neuronal differentiation. *J. Neurobiol.* 51(1):54–65; 2002.
23. Joannides, A. J.; Webber, D. J.; Raineteau, O.; Kelly, C.; Irvine, K. A.; Watts, C.; Rosser, A. E.; Kemp, P. J.; Blakemore, W. F.; Compston, A.; Caldwell, M. A.; Allen, N. D.; Chandran, S. Environmental signals regulate lineage choice and temporal maturation of neural stem cells from human embryonic stem cells. *Brain* 130(Pt. 5):1263–1275; 2007.
24. Johnson, M. A.; Weick, J. P.; Pearce, R. A.; Zhang, S. C. Functional neural development from human embryonic stem cells: Accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. *J. Neurosci.* 27(12):3069–3077; 2007.
25. Kim, D. S.; Kim, J. Y.; Kang, M.; Cho, M. S.; Kim, D. W. Derivation of functional dopamine neurons from embryonic stem cells. *Cell Transplant.* 16(2):117–123; 2007.
26. Kim, M.; Morshead, C. M. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J. Neurosci.* 23(33):10703–10709; 2003.
27. Klassen, H.; Schwartz, M. R.; Bailey, A. H.; Young, M. J. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci. Lett.* 312(3):180–182; 2001.
28. Li, L.; Baroja, M. L.; Majumdar, A.; Chadwick, K.; Rouleau, A.; Gallacher, L.; Ferber, I.; Lebkowski, J.; Martin, T.; Madrenas, J.; Bhatia, M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 22(4):448–456; 2004.
29. Li, Y.; Chopp, M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res.* 838(1–2):1–10; 1999.
30. Liu, G.; Yuan, X.; Zeng, Z.; Tunici, P.; Ng, H.; Abdulkadir, I. R.; Lu, L.; Irvin, D.; Black, K. L.; Yu, J. S. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+

- cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5:67; 2006.
31. LoTurco, J. J.; Blanton, M. G.; Kriegstein, A. R. Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J. Neurosci.* 11(3):792–799; 1991.
 32. Marzesco, A. M.; Janich, P.; Wilsch-Brauninger, M.; Dubreuil, V.; Langenfeld, K.; Corbeil, D.; Huttner, W. B. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 118(Pt. 13): 2849–2858; 2005.
 33. McIlhinney, R. A.; Le Bourdelles, B.; Molnar, E.; Tricaud, N.; Streit, P.; Whiting, P. J. Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* 37(10–11):1355–1367; 1998.
 34. McIlhinney, R. A.; Molnar, E.; Atack, J. R.; Whiting, P. J. Cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1a requires the co-expression of the NR2A subunit in transfected cells. *Neuroscience* 70(4):989–997; 1996.
 35. Moe, M. C.; Varghese, M.; Danilov, A. I.; Westerlund, U.; Ramm-Petersen, J.; Brundin, L.; Svensson, M.; Berg-Johnsen, J.; Langmoen, I. A. Multipotent progenitor cells from the adult human brain: Neurophysiological differentiation to mature neurons. *Brain* 128(Pt. 9):2189–2199; 2005.
 36. Nakamichi, N.; Takarada, T.; Yoneda, Y. Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 110(2):133–149; 2009.
 37. Neprasova, H.; Anderova, M.; Petrik, D.; Vargova, L.; Kubinova, S.; Chvatal, A.; Sykova, E. High extracellular K(+) evokes changes in voltage-dependent K(+) and Na(+) currents and volume regulation in astrocytes. *Pflugers Arch.* 453(6):839–849; 2007.
 38. Nistor, G. I.; Totoiu, M. O.; Haque, N.; Carpenter, M. K.; Keirstead, H. S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49(3):385–396; 2005.
 39. Noaksson, K.; Zoric, N.; Zeng, X.; Rao, M. S.; Hyllner, J.; Semb, H.; Kubista, M.; Sartipy, P. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. *Stem Cells* 23(10):1460–1467; 2005.
 40. Pagani, F.; Lauro, C.; Fucile, S.; Catalano, M.; Limatola, C.; Eusebi, F.; Grassi, F. Functional properties of neurons derived from fetal mouse neurospheres are compatible with those of neuronal precursors in vivo. *J. Neurosci. Res.* 83(8):1494–1501; 2006.
 41. Panchision, D. M.; Chen, H. L.; Pistollato, F.; Papini, D.; Ni, H. T.; Hawley, T. S. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells* 25(6):1560–1570; 2007.
 42. Park, C. H.; Minn, Y. K.; Lee, J. Y.; Choi, D. H.; Chang, M. Y.; Shim, J. W.; Ko, J. Y.; Koh, H. C.; Kang, M. J.; Kang, J. S.; Rhie, D. J.; Lee, Y. S.; Son, H.; Moon, S. Y.; Kim, K. S.; Lee, S. H. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J. Neurochem.* 92(5):1265–1276; 2005.
 43. Pruszak, J.; Sonntag, K. C.; Aung, M. H.; Sanchez-Pernaute, R.; Isacson, O. Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells* 25(9):2257–2268; 2007.
 44. Reubinoff, B. E.; Itsykson, P.; Turetsky, T.; Pera, M. F.; Reinhartz, E.; Itzik, A.; Ben-Hur, T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19(12):1134–1140; 2001.
 45. Reubinoff, B. E.; Pera, M. F.; Fong, C. Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18(4):399–404; 2000.
 46. Schulz, T. C.; Noggle, S. A.; Palmarini, G. M.; Weiler, D. A.; Lyons, I. G.; Pensa, K. A.; Meedeniya, A. C.; Davidson, B. P.; Lambert, N. A.; Condie, B. G. Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells* 22(7): 1218–1238; 2004.
 47. Shewan, D.; Calaora, V.; Nielsen, P.; Cohen, J.; Rougon, G.; Moreau, H. mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 16(8):2624–2634; 1996.
 48. Shin, H. Y.; Kim, J. H.; Phi, J. H.; Park, C. K.; Kim, J. E.; Paek, S. H.; Wang, K. C.; Kim, D. G. Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 86(2):356–367; 2008.
 49. Singh, S. K.; Clarke, I. D.; Terasaki, M.; Bonn, V. E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63(18):5821–5828; 2003.
 50. Svendsen, C. N.; ter Borg, M. G.; Armstrong, R. J.; Rosser, A. E.; Chandran, S.; Ostenfeld, T.; Caldwell, M. A. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J. Neurosci. Methods* 85(2):141–152; 1998.
 51. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147; 1998.
 52. Uchida, N.; Buck, D. W.; He, D.; Reitsma, M. J.; Masek, M.; Phan, T. V.; Tsukamoto, A. S.; Gage, F. H.; Weissman, I. L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(26):14720–14725; 2000.
 53. Wang, D. D.; Krueger, D. D.; Bordey, A. Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ. *J. Neurophysiol.* 90(4):2291–2302; 2003.
 54. Wang, L. P.; Kempermann, G.; Kettenmann, H. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol. Cell. Neurosci.* 29(2):181–189; 2005.
 55. Yamada, J.; Okabe, A.; Toyoda, H.; Kilb, W.; Luhmann, H. J.; Fukuda, A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 557(Pt. 3):829–841; 2004.
 56. Yan, Y.; Yang, D.; Zarnowska, E. D.; Du, Z.; Werbel, B.; Valliere, C.; Pearce, R. A.; Thomson, J. A.; Zhang, S. C. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23(6):781–790; 2005.
 57. Zhang, R. L.; Zhang, Z. G.; Zhang, L.; Chopp, M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105(1):33–41; 2001.
 58. Zhang, S. C.; Wernig, M.; Duncan, I. D.; Brustle, O.; Thomson, J. A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19(12):1129–1133; 2001.

Human Induced Pluripotent Stem Cells Improve Stroke Outcome and Reduce Secondary Degeneration in the Recipient Brain

Jérôme Polentes,* Pavla Jendelova,† Michel Cailleret,* Holger Braun,‡ Nataliya Romanyuk,† Philippe Tropel,*§ Marion Brenot,* Valerie Itier,*¶ Christine Seminatore,* Kathrin Baldauf,‡ Karolina Turnovcova,† Daniel Jirak,# Marius Teletin,** Julien Côme,* Johana Tournois,* Klaus Reymann,‡ Eva Sykova,† Stéphane Viville,§** and Brigitte Onteniente*

*I-Stem, INSERM UMR861, UEVE, Evry Cedex, France

†Institute of Experimental Medicine, ASCR, Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Prague, Czech Republic

‡Leibniz Institut für Neurobiologie, Magdeburg, Germany

§IGBMC, Dpt Biologie Cellulaire & Développement, Illkirch-Graffenstaden Cedex, France

¶Université Paris-Est Créteil, Créteil Cedex, France

#Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

**Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire, Strasbourg Cedex, France

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are a most appealing source for cell replacement therapy in acute brain lesions. We evaluated the potential of hiPSC therapy in stroke by transplanting hiPSC-derived neural progenitor cells (NPCs) into the postischemic striatum. Grafts received host tyrosine hydroxylase-positive afferents and contained developing interneurons and homotopic GABAergic medium spiny neurons that, with time, sent axons to the host substantia nigra. Grafting reversed stroke-induced somatosensory and motor deficits. Grafting also protected the host substantia nigra from the atrophy that follows disruption of reciprocal striatonigral connections. Graft innervation by tyrosine hydroxylase fibers, substantia nigra protection, and somatosensory functional recovery were early events, temporally dissociated from the slow maturation of GABAergic neurons in the grafts and innervation of substantia nigra. This suggests that grafted hiPSC-NPCs initially exert trophic effects on host brain structures, which precede integration and potential pathway reconstruction. We believe that transplantation of NPCs derived from hiPSCs can provide useful interventions to limit the functional consequences of stroke through both neuroprotective effects and reconstruction of impaired pathways.

Key words: Cell replacement therapy; Cerebral ischemia; Reprogramming; Intracerebral transplantation; Neurovascular lesions

INTRODUCTION

Despite decades of academic and industrial research, cerebrovascular diseases continue to thwart the attempts of developing neuroprotective treatments and remain a leading cause of death and long-term disability worldwide (49). The proof of principle of stem cell (SC) therapy in stroke has been provided at experimental level with a wide array of cell sources that, not exhaustively, include neural progenitors from fetal and adult neural tissues, mesenchymal SCs from bone marrow (BMSCs) or umbilical cord blood, peripheral blood cells, immortalized cell lines, and embryonic SCs (ESCs) of rodent, primate, and

human origin (5,7,27,35,47,53). Encouraging experimental data have fostered Phase I–II trials, so far published with BMSCs and neural cell lines (3,24).

Induced pluripotent SCs (iPSCs) (45) have added a unique source to the panel of available resources for SC therapy. iPSCs possess the cardinal features of ESCs, pluripotency and unlimited self-renewal, which are definitive assets for the large-scale and standardized production of therapeutic products. In addition, hiPSCs have the potential to overcome immune rejection with human leukocyte antigen (HLA)-specific cells (23,34). On the iPSCs “dark side,” reprogramming can leave epigenetic and genetic

modifications (17,21,28,48) with still unknown functional repercussions. As a result, the fate and effects of iPSC-derived neural progeny must be thoroughly investigated in preclinical models before therapies based on hiPSCs are proposed to clinicians (10).

In contrast with the unprecedented therapeutic options offered by iPSCs, illustrations of therapeutic transplantation applications are still scarce. Thus far, two reports have described iPSC transplantation in stroke models, firstly, confirming their ability to form teratoma after intracerebral transplantation (20) and, secondly, showing a reduction of stroke-induced motor dysfunction after subdural transplantation with fibrin glue (9). Both reports were performed with undifferentiated mouse iPSCs, leaving the potential of human neural derivatives unexplored.

In this study, hiPSC-derived neural progenitor cells (NPCs) were used to define their ability to reverse stroke-induced functional and structural impairments after intracerebral transplantation. Our results show that hiPSC-NPCs not only rescue sensorimotor and motor functions but protect remote areas connected with the lesioned site from atrophy. Mismatches in the kinetics of functional and structural events suggest the existence of sequential mechanisms, independent, then dependent, on homotopic cell replacement and reconstruction of lost pathways.

MATERIALS AND METHODS

Validation of hiPSC Lines and Neural Induction

The I-Stem-Strasbourg (I-S)hiPSC lines were derived from MRC5 and IMR90 human fetal lung fibroblasts (ATCC, Manassas VA, USA) transduced with the pSin-EF2-octamer-binding transcription factor 4 (Oct4)-Pur, pSin-EF2-sex-determining region Y Box 2 (Sox2)-Pur, pSin-EF2-Nanog-Pur, and pSin-EF2-Lin28-Pur13 plasmids from Addgene (Cambridge, MA, USA) according to Yu et al. (52). Viruses were produced by Vectalys

(Labège, France; MOI between 7 and 23). The culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum) was progressively modified over 1 week to serum-free hESC medium containing 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Transduced fibroblasts were seeded onto mouse embryonic feeder cells and grown in hESC medium. Colonies with ESC morphology appeared after 3–6 weeks and were clonally expanded for 5 weeks with mechanical passage every 5–7 days. Seven colonies from IMR90 and five from MRC5 cultures were selected on a morphological basis and validated for the expression of hESC self-renewal genes and surface markers and for pluripotency through embryoid bodies and teratoma formation before commitment into the neural lineage. Data were compared to hESC lines that included the SA001 (XY; Cellartis AB, Gothenburg, Sweden), H9 (XX; WiCell, Madison, WI, USA), and CCTL14 (XX; Masaryk University, Brno, Czech Republic) lines.

Quantitative PCR Analysis

Real-time quantitative (q) PCR (Primer list in Table 1) was performed with the RNeasy microkit (Qiagen, France) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, France) on 0.5 µg cDNA. Normalization was achieved against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) RNA using the $\Delta\Delta C_t$ method for quantification (ABI-Prism Software, Applied Biosystems).

Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry (FACSCalibur Flow Cytometer, BD Biosciences) analysis of the ESC-specific cell surface markers stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) [mouse IgM coupled to allophycocyanin (APC)], SSEA-4 (mouse IgG3 coupled to Alexa-Fluor 488), and TRA-1-81 [mouse IgM coupled to phycoerythrin (PE)] was performed

Table 1. List of Primers Used for qRT-PCR

Gene	Forward	Reverse	Size
OCT3/4	CTTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	168
NANOG	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	158
SOX2	ACAGCAAATGACAGCTGCAAA	TCGGCATCGCGGTTTTT	67
KLF4	TATGACCCACACTGCCAGAA	TGGGAACCTTGACCATGATTG	110
LIN28	GGCAGTGGAGTTCACCTTT	GCTTCTGCATGCTCTTTCCT	123
DNMT	CCAATCCTGGAGGCTATCCG	ACTGGGGTGTGAGAGCCAT	152
CRIP1	AAGATGGCCCGCTCTCTTAC	AGATGGACGAGCAAATTCCTG	108
CK18	TGAGACGTACAGTCCAGTCCT	GCTCCATCTGTAGGGCGTAG	114
KDR	AGCGATGGCCTCTTCTGTAA	ACACGACTCCATGTTGGTCA	172
SOX17	CCTGGGTTTTTGTGTTGTGCT	GCTGTTTTTGGGACACATTCA	206
AFP	ACTGCAATTGAGAAACCCACTGGAGATG	CGATGCTGGAGTGGGCTTTTTGTGT	192
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAG	TCGCCCCACTTGATTTTGGAGG	266

DNMT, DNA methyltransferase; CK18, cytokeratin 18; KDR, kinase insert domain protein receptor; AFP, α -fetoprotein; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

on the selected clones and on SA001 with appropriate isotype controls (all antibodies from BD Biosciences).

Embryoid Bodies Formation

Embryoid bodies (EBs) were formed after collagenase dissociation (1 mg/ml, Invitrogen) and seeding on ultra-low attachment plates (Nunc, Dutscher) for 3–6 weeks without bFGF. EBs were analyzed after 4 and 14 days by qPCR for markers of the three germ layers.

Karyotype Analysis

I-ShiPSCs were harvested for metaphase chromosomes at 70% confluence. G-banding chromosome analysis was performed with the Wright/Giemsa (Merck) technique after colchicine (20 mg/ml, Eurobio) incubation, hypotonic shock (KCl 0.057 M), and fixation with Carnoy's solution (3:1 methanol/acetic acid). Analysis was performed with the Ikaros software (MetaSystems, Altusheim). Multicolor fluorescent in situ hybridization (mFISH) were performed at passages 18 (both lines) and at p56 (I-I90) or p59 (I-M5) with the cocktail painting Probe Cy5 B-test detection kit and Isis software (MetaSystems, Altusheim).

Teratoma Formation

Pluripotency was further investigated with the teratoma test performed in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice (NOD/SCID; Charles River, France) after subcutaneous injection of 2×10^6 cells, with anatomic-pathological analysis 2 months postinjection.

Neural Induction

Early neural precursors (ENPs) were produced in low-attachment cultures in the presence of Noggin (R&D Systems), the transforming growth factor- β pathway inhibitor SB431542 (Tocris Biosci.), bFGF (10 μ g/ml, Preprotech), and human brain-derived growth factor (hBDNF; 20 μ g/ml, R&D Systems) (8). NPCs were produced from ENPs in the presence of 20 ng/ml hBDNF for 7 days. Expression levels of pluripotency and neural cell markers were quantified by qPCR and flow cytometry, respectively. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) antibodies included anti-Nanog, TRA-1-60 and SSEA4 (eBioscience), CD29, CD15 (SSEA1), CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM), and β III-tubulin (all from BD Pharmingen), along with unconjugated mouse primary antibodies against nestin and neurofilament 70 kDa (NF70) (Abcam), secondary rat anti-mouse IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; eBioscience), and secondary donkey anti-rabbit IgG conjugated with APC (Jackson ImmunoResearch Labs).

Voltage clamp was used to record potassium outward current in the whole-cell configuration (20–25°C) filtered at 3.3 kHz, using the HEKA data acquisition/analysis

system. Pipettes (5–7 M Ω) were pulled from borosilicate glass with P97-sutter and filled with (mM): KCl 155, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, HEPES 10, and EGTA 10 (pH 7.3). Cells were maintained in (mM): NaCl 150, CaCl₂ 3, KCl 2.5, MgCl₂ 1, HEPES 10 (pH 7.6). Steps of +10 mV from the holding voltage V_h -90 mV were applied during 50 ms to record A-type calcium current (I_A), 500 ms to record delayed rectifying current (I_{DR}), and 50 ms to record voltage-gated sodium current (I_{Na}).

Experimental Surgery

All animal experimentation was performed in compliance with European ethical guidelines (86/609/EEC). Adult male (280 g) Sprague–Dawley rats (Charles River; $n=187$) were anesthetized (1–2% isoflurane/30% oxygen/75% nitrous oxide) before receiving a 90-min middle cerebral artery occlusion MCAO (30) with a heparinized 4.0 nylon monofilament (Doccol Corporation; (40) SPPK5; MyDesign MCAO suture PK5; coating length 2–3 mm, tip diameter 0.35 ± 0.02 mm). Rectal temperature was maintained between 36.7°C and 37.5°C with a homeothermic blanket (Harvard Apparatus). Three animals died during MCAO surgery, either during anesthesia ($n=1$) or at reperfusion ($n=2$). One week after MCAO, animals were randomly distributed into four groups: Control (MCAO nongrafted; $n=35$), I-I90-NPC ($n=29$), I-M5-NPC ($n=29$), and SA001-NPC ($n=15$). A group of nonlesioned/nongrafted animals ($n=12$) was also used for quantification of substantia nigra (SN) volumes. Grafted animals received a stereotaxic injection of 1 μ l of culture medium (Control) alone or containing 100,000 NPCs from I-I90, I-M5, or SA001 (coordinates from bregma A-P: 0.5 mm; Lat: 2 mm; D-V: 5.5 mm) with a needle inclination of 15° to reach the lesion cavity in the lateral quadrant of the striatum. Three additional animals died during this procedure (two during anesthesia, one from bleeding at removal of the needle), resulting in a final distribution of Control ($n=34$), I-I90-NPC ($n=28$), I-M5-NPC ($n=29$), SA001-NPC ($n=14$). Animals were immunosuppressed with a daily injection of 10 mg kg⁻¹ cyclosporine A (Sandimmun, Novartis) starting the day before transplantation for 2 months. Body weight was followed daily.

Behavioral Analysis

All behavioral tests were conducted by investigators blinded to the experimental conditions. To avoid habituation of animals to repeated behavioral investigation (18), I-I90-NPC-grafted animals were used for the adhesive removal test and I-M5-NPC-grafted animals for the staircase test. Animals grafted with I-I90-, I-M5- and SA001-NPCs were used for the apomorphin-induced rotation test. For the adhesive removal test (I-I90: $n=28$; Nongrafted: $n=19$ at the start of experiment), a sticky colored paper dot (12 mm diameter) was placed on the

rat left palm and fingers, and the time to remove the dot was measured. Rats were pretrained for 4 days before MCAO and were tested three times a week. The staircase test was performed with sucrose pellets (Campden Instruments Ltd.; three pellets on each side). Animals (I-M5: $n=29$; Nongrafted: $n=15$ at the start of the experiment) were food-deprived to 85% of their normal weight and trained for 3 weeks (two trials per day, 5 days a week) before MCAO and three times a week after transplantation. Scores indicate the number of pellets grasped by the paw contralateral to the lesion. The apomorphin-induced rotation test (motor dysfunction, pharmacological) was performed on grafted (I-I90: $n=28$; I-M5: $n=29$; SA001: $n=14$ at the start of the experiment) and on nongrafted ($n=34$) animals. Turns were counted during 30 min following intraperitoneal injection of 1 mg/kg apomorphin-HCl (Sigma). Deficits were quantified using the formula modified from Arvidsson et al (2): $\text{Score} = \text{IpsiCyl} + (2 \times \text{IpsiItself}) - \text{ContrCyl} - (2 \times \text{ContrItself})$, where IpsiCyl: rotation ipsilateral to the lesion around central cylinder, IpsiItself: rotation ipsilateral on itself, ContrCyl: rotation contralateral to the lesion around the central cylinder, ContrItself: rotation contralateral on itself. Neurological severity scores (NSS) were performed on all groups up to 4 months postgrafting (39). Function was graded on a 0 (normal) to 10 (severely impaired) scale.

Tissue Processing

Rats were anesthetized with 150 mg/kg sodium pentobarbital before intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde phosphate-buffered to pH 7.4. Brains were postfixed overnight in the same fixative solution and cryoprotected with 30% sucrose for 48 h. Thirty-micrometer-thick cryostat sections were serially collected with a Leica CM cryostat. Immunohistochemistry was performed with rabbit polyclonal antibodies to human nestin (Chemicon, AB5922), glial fibrillary acidic protein (GFAP; Sigma, G9269), dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32; Santa Cruz Biotech., sc-21601), paired box protein 6 (Pax6; Covance, PRB-278P), unspecific tyrosine hydroxylase (TH; Jacques Boy, 208020234), Ki67 (Abcam, ab833), and neuron-specific class III beta-tubulin (TUJ1; Covance, MMS-435P) and with mouse IgG antibodies to human nuclei (HNA; Chemicon, MAB1281), human mitochondria (MTCO2, Abcam, 3298), Oct4 (Santa Cruz Biotech., SC-5279), human NCAM (SantaCruz Biotech., sc-106), and microtubule-associated protein 2 (MAP2; Sigma, M1406). Secondary antibodies were Alexa488- or Alexa555-labeled (A11001 and A21428, respectively, Invitrogen). IB4 labeling was performed with isolectin *Griffonia simplicifolia* (GS)-IB4 biotin conjugate (Invitrogen, I2141) and revealed with Alexa647 (Jackson Labs., 016-600-084). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used to visualize

the nuclei. Colorimetric immunohistochemistry was performed using a Discovery XT (Ventana) staining automate. Controls were performed with the corresponding isotype when available or with secondary antibodies only. Observations were made using a Zeiss Axioplan microscope, and image analysis was performed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Confocal microscopy was done on a Zeiss LSM Pascal Exciter microscope. Ki67-, DARPP-32- and TH-positive neuron counts were performed with unbiased stereological evaluation on three (Ki67) or six (DARPP-32) consecutive 30- μm -thick sections at 120- μm interval. TH-positive neuron counts were performed from level -4.8 to -6.3 from bregma, independently of the SN volume. Volumes were calculated using the FreeD software (1).

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI was performed using a 4.7-T Bruker spectrometer equipped with a custom made surface coil. A T2-weighted turbospin echo sequence rapid acquisition with relaxation enhancement [RARE; repetition time (TR)=3,000 ms, effective echo time (TE)=36.0 ms, turbo factor=8, number of acquisitions (AC)=8, field of view=3.5 cm, matrix=256 \times 256, slice thickness=0.85 mm, acquisition time=9'36"] was used.

Statistical Analysis

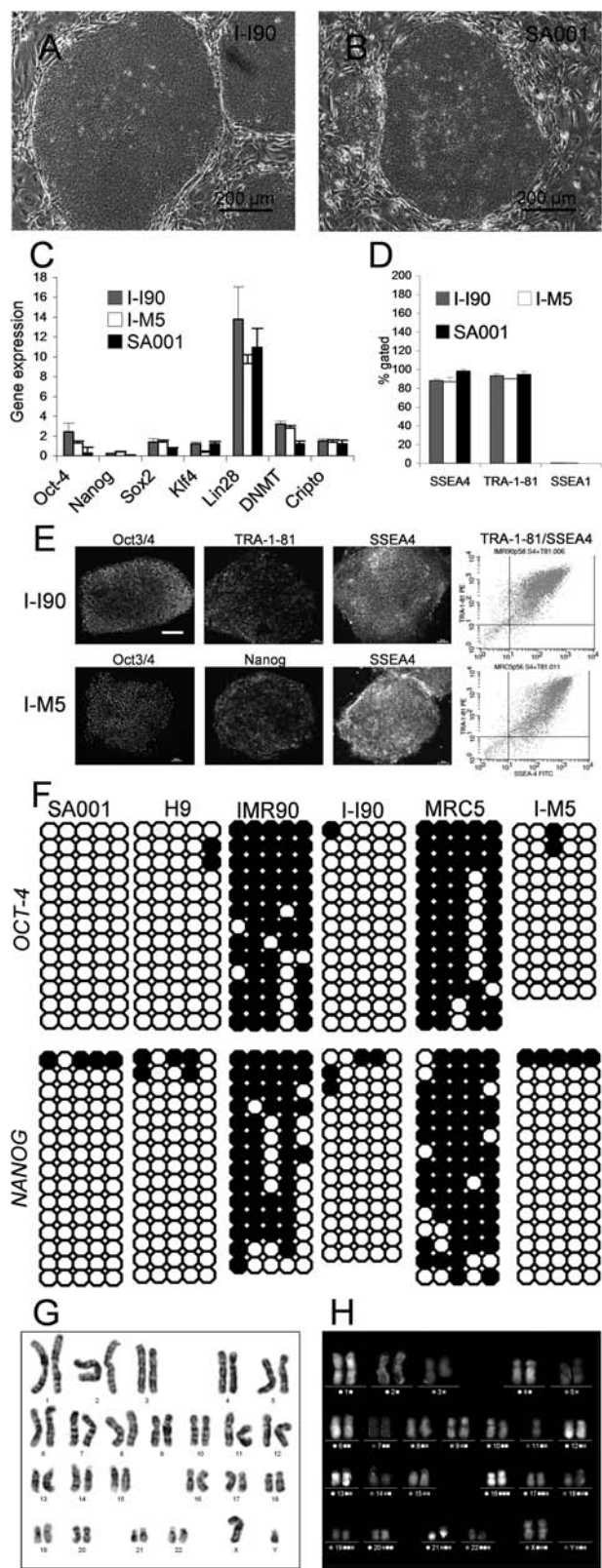
Data are expressed as means \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using the JMP software (SAS). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Data were analyzed using one-way or repeated-measures ANOVA and Student's *t* test, with Bonferroni-Dunn post hoc test.

RESULTS

Production of hiPSC and Transplants

The two I-ShiPSC lines, I-I90 (XX) (25) and I-M5 (XY), were validated by comparison to the SA001 (Cellartis AB) and H9 (WiCell) hESC lines (Figs. 1 and 2). I-ShiPSC presented all characteristics of pluripotent SCs, including morphology (Fig. 1A, B), expression of hESC-specific markers (Fig. 1C–E), methylation pattern on *OCT4* and *NANOG* promoters (Fig. 1F), and karyotype stability (Fig. 1G, H). I-ShiPSCs were able to produce EBs (Fig. 2A, B) with hESC-like gene expression (Fig. 2C, D) and formed teratoma after implantation into the immunodeficient mouse (Fig. 2E–H). Early neural precursors (ENPs) were derived using the dual-small body size mothers against decapentaplegic (SMAD) inhibition protocol described for hESCs (Fig. 3). Rosette-like ENPs (Fig. 3A) contained Nanog (Fig. 3B), Pax6 (Fig. 3C), and no Oct4 (Fig. 3C). RT-PCR revealed elevated levels of Nanog mRNA in I-ShiPSC-ENPs (Table 2). I-M5-ENPs additionally exhibited elevated Sox2 mRNA contents



(Table 2). Nanog mRNA levels were no longer elevated in NPCs (Fig. 3H), which displayed levels of neuronal differentiation markers similar to hESC-NPCs (Fig. 3H). NPCs were uniformly labeled for Sox2 (Fig. 3D) and contained TUJ1-positive neurons (Fig. 3D) and a small proportion of GFAP astrocytes (Fig. 3E). Neuronal differentiation was confirmed with electrophysiology (Fig. 3I) (see legend). The ability of I-ShiPSC-NPCs to maintain their neuronal commitment into a rat brain environment was assessed in vitro by seeding on primary cultures of embryonic rat cortex (Fig. 3F). Neuronal differentiation was observed within 2 days (Fig. 3G).

Figure 4 depicts the global scheme of the experiments.

hiPSC-NPCs Differentiate Into GABAergic Neurons After Transplantation Into the Postischemic Brain

As previously described in this paradigm (40), 90 min MCAO resulted in a lesion restricted to the lateral quadrant of the striatum (Fig. 5A) in 65% of the animals. The other animals had larger lesions, encompassing the cortical and subcortical territories of the artery (Fig. 5B), and were not kept in the study. One month after transplantation, grafts could be identified on T2-weighted MRI (Fig. 5C) and histology (Fig. 5D). Cells were packed at injection site, with some scattered into the proximal parenchyma (Fig. 5E), and were mainly nestin positive (Fig. 5F). Grafts also contained cells positive for Sox2 (Fig. 5G) and Pax6 (Fig. 5H), but not for Oct4 (Fig. 5G), indicating sustained neural commitment in the postischemic environment. Host-graft interactions were illustrated by human MAP2 processes entering the host tissue (Fig. 5I) and by patches of host-derived tyrosine hydroxylase (TH)-positive axons (Fig. 5J) into the grafts. DARPP-32-positive neurons with an immature morphology were distributed in patches over the whole graft, indicating

FACING COLUMN

Figure 1. Validation of I-ShiPSC lines. (A, B) I-ShiPSC colonies displayed a hESC-like morphology (A: I-I90; B: SA001). (C) Quantitative PCR of self-renewal and pluripotency markers. Relative expression levels normalized to GAPDH. Mean \pm SD of three independent experiments. I-ShiPSCs display no significant differences to SA001. (D) Flow cytometry for hESCs-specific cell surface markers. Levels of the pluripotency markers SSEA4 and TRA-1-81 and the differentiation marker SSEA1 in I-ShiPSCs and hESCs are similar. (E) Immunohistochemistry and FACS plots for both I-ShiPSC lines illustrating the expression of hESC-specific markers. Scale bar: 80 μ m. (F) DNA methylation status of *OCT4* and *NANOG* promoter regions in hESCs, I-ShiPSC lines, and corresponding fibroblasts. Open and closed circles indicate unmethylated and methylated CpG dinucleotides, respectively. (G, H) Examples of karyotype performed with G banding (G: I-M5) and mFISH (H: I-I90) showing the absence of aneuploidy and a normal set of 46 XY (I-M5) or XX (I-I90) human chromosomes after 56 or 59 passages, respectively.

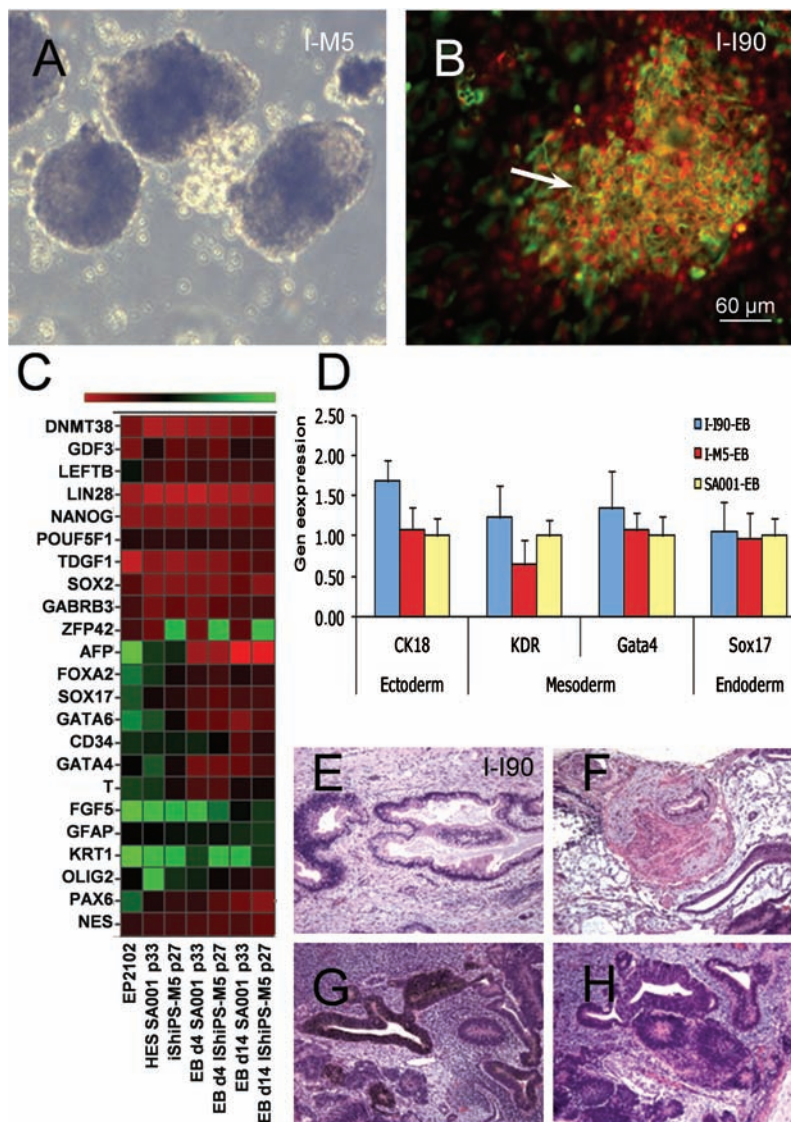


Figure 2. Assessment of I-ShiPSCs pluripotency. (A) Embryoid bodies (EBs) formed with I-M5. (B) Expression of neuron-specific class III beta-tubulin (green) and Pax6 (red) in a discrete area of an I-I90-derived EBs (day 7) showing neural differentiation. Arrow points to a neural rosette. (C) Microfluidic card of human SCs pluripotency genes; example of I-M5- and SA001-EBs at 4 and 14 days. Levels of gene expression relative to GAPDH are indicated by color changes, from red (high expression levels, low ΔCt) to green (low expression levels, high ΔCt). EP2102: control embryonal carcinoma cell line used as a reference for hESC. (D) QPCR for markers of differentiation in EBs from I-ShiPSCs and SA001 (Ectoderm: cytokeratin 18 (CK18); Mesoderm: Gata4, KDR; Endoderm: Sox17). The SA001-EBs mRNA levels are set as 1. Mean \pm SD of two independent experiments. GAPDH levels were stable among cell lines: mean GAPDH Ct in EBs = 29.12 ± 1.06 . (E–H) Example of teratoma derived from I-I90 showing secretory epithelium (E), smooth muscle (F), pigmented epithelium (G), and neural tissue (H). Scale bar: 250 μm .

that some NPC had initiated terminal differentiation (Fig. 5M). Similar results were obtained with SA001-NPCs (Fig. 5K, L)

After 4 months, the graft had spread into the lesion cavity, although enlargement of the lateral ventricle was still visible (Fig. 6A). Grafts formed a mixed tissue with host-derived blood vessels (Fig. 6B) and astrocytes (Fig. 6C). GABAergic striatal neurons formed clusters of fully differentiated hDARPP-32-positive neurons

(Fig. 6D, E) and scattered calretinin-positive interneurons (Fig. 6F) were observed. In addition to DARPP-32, a D1-receptor-linked protein, a subpopulation of grafted neurons had type 2 dopaminergic receptors (Fig. 6G). The number of DARPP-32 neurons was not significantly different among grafts from the three cell types: SA001: 172.43 ± 7.65 cells/mm³; I-M5: 140.59 ± 10.74 cells/mm³; I-I90: 162 ± 13.04 cells/mm³ (one-way ANOVA: $p = 0.84$; $F = 0.18$; $d.f. = 19$).

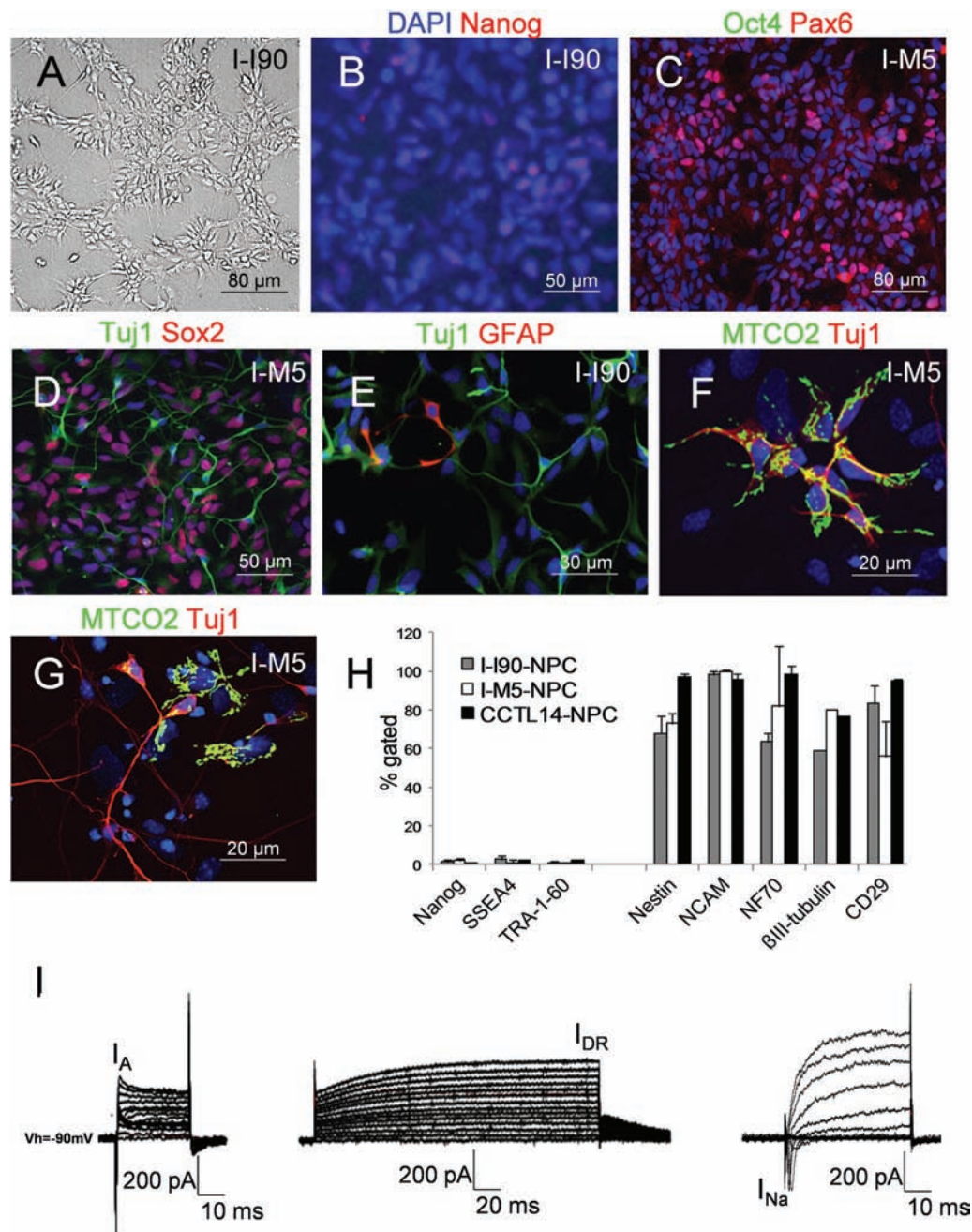


Figure 3. I-ShiPSCs differentiation into ENPs and functional NPCs. (A) ENPs form typical neural rosettes still display detectable levels of Nanog (B), express Pax6 (C) and do not express Oct4 (C). (D) After 7 days of differentiation, NPCs characterize by homogeneous Sox2 expression and the presence of TUJ1-positive young neurons. (E) NPCs generate a small proportion of GFAP-positive astrocytes ($2.77 \pm 0.02\%$). (F, G) Differentiation of NPCs into young (2 days; F) and mature (5 days; G) neurons after seeding on rat cortex primary culture. (H) FACS analysis showing a similarly low expression of hESC markers (Nanog, SSEA4, TRA-1-60) and high expression of neuronal differentiation markers (Nestin, NCAM, NF70, β III-tubulin, integrin CD29) in NPCs from I-ShiPSCs and hESCs (CCTL14 line). (I) Representative electrophysiological traces of patch-clamp recording showing fast transient current (I_A) and delayed rectifier current (I_{DR}) in ENPs. Sodium channels (I_{Na}) indicative of full neuronal maturation appear in NPCs within 5–7 days of differentiation.

Table 2. RT-PCR Quantification of mRNA Levels for hESC Genes in I-ShiPSC and SA001 hESC-Early Neural Progenitors (ENPs)

mRNA/Cell Line	SA001-ENP	I-M5-ENP	I-I90-ENP
Oct-4	0.0067±0.003	0.021±0.001	0.01±0.004
Nanog	0.0016±0.02	0.196±0.14*	0.134±0.07*
Sox2	0.039±0.006	0.108±0.07*	0.076±0.027

Mean ± SD of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ normalized to GAPDH. * $p < 0.05$ compared to SA001-ENPs.

Sustained proliferation is a major side effect after grafting NPC into the lesioned striatum. Quantification of the mitotic activity with Ki67 immunoreactivity identified $2.34 \pm 0.3\%$ dividing cells in grafts at 4 months. However, the absence of colocalization with the human mitochondrial marker MTCO2 indicated that these cells were of host origin (Fig. 6H). No nonneural structures and no overgrowths were observed along the 4 months of the study.

hiPSC-NPCs Rescue Functional Impairments

Scoring of sensorimotor dysfunction (Fig. 7) with the tape removal test indicated a significant recovery of grafted animals from 2 weeks posttransplantation (Fig. 7A). Significance was maintained over the 4 months of the study, in spite of an important recovery in non-grafted animals. As reported, MCAO animals typically displayed severe long-lasting motor asymmetry in the apomorphin-induced rotation test (Fig. 7C). Grafting firstly decreased the aggravation observed between 15 and 45 days post-MCAO and, from 2 months, significantly reduced the deterioration. Baseline scores were comparable in the three groups, indicating the absence of an initial unbalance in rotation scores: SA001: 42.5 ± 24.52 ; I-M5: 33.6 ± 12.92 ; I-I90: 35.89 ± 13.18 ; one-way ANOVA: $p = 0.36$; $F = 1.10$; $d.f. = 39$. Other tests [Montoya staircase (Fig. 7B) and neurological scores] were not informative

due to spontaneous resuming of pre-MCAO scores in nongrafted animals.

hiPSC-NPCs Project to Correct Target Areas

We used the hNCAM antibody to identify projections from grafted cells. One month after transplantation, hNCAM fibers were observed in myelinated fiber bundles of the host striatum and in the globus pallidus (Fig. 8A, B) at a maximal distance of 2 mm caudal to the injection site. No human fibers were observed in the host SN (Fig. 8C). After 2 months, human axons had extended throughout the entopeduncular nucleus (Fig. 8D, E) to the most caudal part of the SN (Fig. 8F–G). A dense graft-derived axonal network was observed in SN *pars reticulata* (SNr) (Fig. 8H), in close association to TH-positive dendrites (Fig. 8I). A few hNCAM fibers were observed in the thalamus and in the corpus callosum.

hiPS-NPCs Limit Secondary Neurodegeneration in the Host Brain

T2-weighted MRI in MCAO animals revealed a persistent atrophy of the hindbrain at the level of the SN (Fig. 9A), which was confirmed at one month by TH staining (Fig. 9B). At 1 month, MCAO animals had a reduced SNr volume on the side ipsilateral to the lesion ($61.1 \pm 16.8\%$ reduction compared to nonlesioned/non-grafted animals; $p = 0.010$) (Fig. 9D). Figure 9C shows

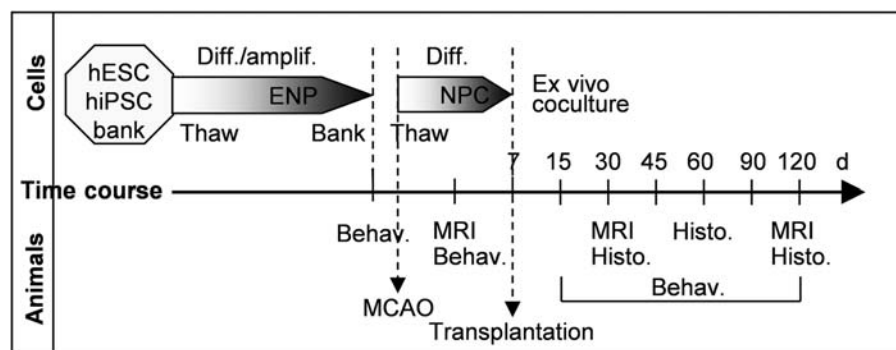


Figure 4. Schematic time course of the experiments. Experiments start with the differentiation of pluripotent SCs into ENPs and banking. ENPs are thawed when MCAO is performed and are committed to NPCs for one week before transplantation. Animals were followed with magnetic resonance imaging (MRI) and behavioral analysis over 4 months, and histological data were acquired at 1, 2, and 4 months. Diff., differentiation; amplif., amplification; Behav., behavioral analysis; Histo., histological analysis; d, days post-MCAO.

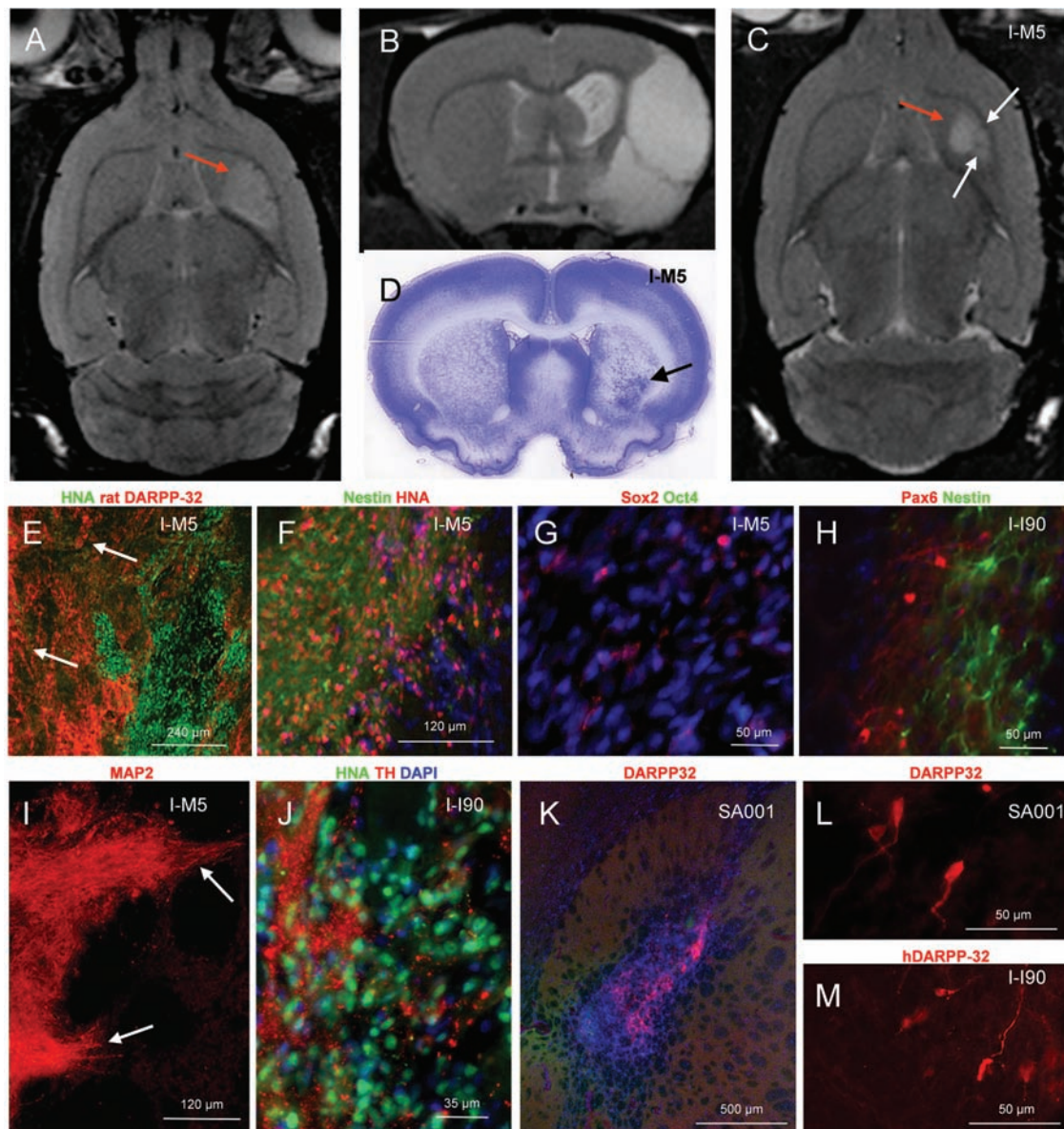


Figure 5. One month posttransplantation. (A) Animals with lesions restricted to the striatum were used in this study. (B) Animals with larger lesions were excluded. (C) The lesion (red arrow) and graft (white arrows) are distinguished on T2-weighted MRI by their intensity. (D) Postmortem histology shows the graft (arrow) in the lateral quadrant of the striatum. (E) Clusters of human (HNA) cells (arrows) have migrated away from injection site into the perilesional host parenchyma, although on short distances. Grafts contain a majority of nestin- (F), Sox2-, but no Oct4-positive cells (G), and small clusters of Pax6 cells (H). MAP2 processes originating from the graft gather into bundles to enter the host parenchyma (I, arrows). Grafts also contained TH-labeled fibers (J) and a small number of immature DARPP-32 neurons (L, M). (K) SA001-NPCgrafts had similar features, with clusters of immature DARPP-32 neurons (L).

that variations among the three groups (SA001-NPCs, I-I90-NPCs, I-M5-NPCs) were not significant [one-way ANOVA: SN pars compacta (SNc): $p=0.66$, $F=0.43$, $dff=17$; SNr $p=0.59$, $F=0.54$, $dff=17$]. Grafting reduced the atrophy of pars reticulata to $27.13 \pm 11.50\%$ (Fig. 9D) ($p=0.017$, $t=2.26$, $dff=8$). MCAO-induced reduction of the volume occupied by TH cell bodies in pars compacta was not significant. However, nonbiased stereological quantification of TH-positive cell bodies

(Fig. 9E) indicated a $46.20 \pm 12.41\%$ loss of TH neurons after MCAO ($p=0.03$), reduced to a $21.11 \pm 6.65\%$ loss after grafting ($p=0.02$) (Fig. 9F), corresponding to a 47% protection.

DISCUSSION

This study shows that intracerebral transplantation of hiPSC-NPCs in the subacute phase of cerebral ischemia has the potential to reverse functional deficits and to limit

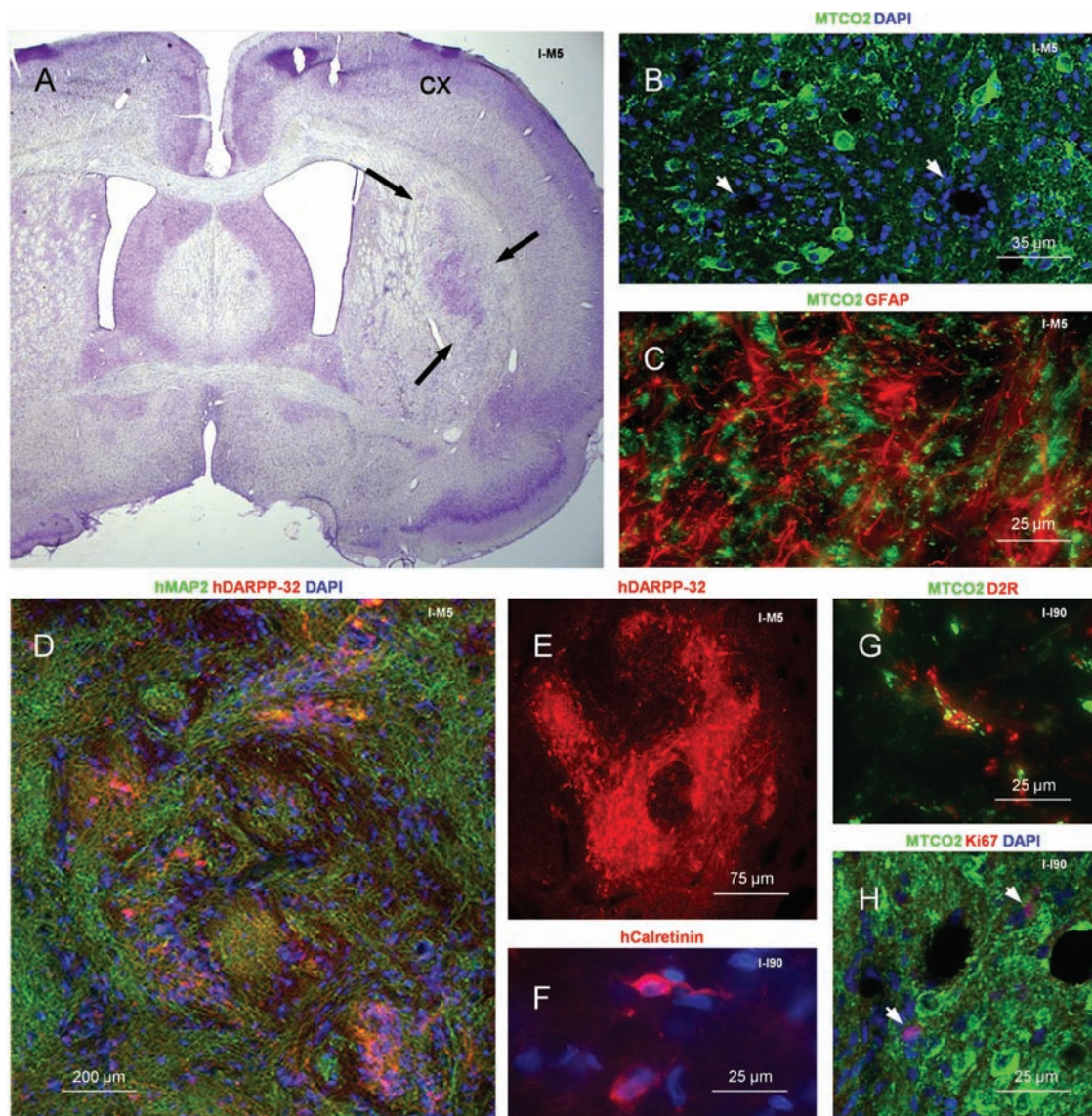


Figure 6. Four months posttransplantation. (A) Cresyl violet staining showing the graft in the lateral striatum (black arrows). Grafts formed a mixed tissue with the host, with MTCO2-negative (B; arrow heads) endothelial cells and astrocytes (C). (D–F) Grafts contained large clusters of DARPP-32 projection neurons (D, E), calretinin interneurons (F), and neurons with D2 dopaminergic receptors (G). (H) Ki67 labeling showing dividing cells (arrow heads) of rat (MTCO2-negative) origin.

degeneration of remote brain structures connected to the lesion site.

On the cell biology aspect, this study firstly confirmed that hiPSC and hESC can respond to the same differentiation protocol. NPCs were derived according to the dual-SMAD inhibitor protocol developed for hESCs, based on the inhibition of nodal/activin and BMP signaling pathways and resulting in accelerated commitment of pluripotent SCs (PSCs) into NSCs (8). A main advantage of the NSC protocol is the rapid production of large pools of homogenous NPCs after 5–7 days of differentiation

from frozen stocks. This protocol reduces individual differences in neural commitment among PSCs (8).

Effective cell replacement therapy critically relies on the ability of transplanted progenitors to generate neurons with topographically relevant phenotypes. Striatal stroke induces massive loss of medium spiny GABAergic neurons, leading to the disruption of the striatonigral loop. As described for hESC-NPCs in this model (6,42), grafted hiPSC-NPCs accurately generated long-projection GABAergic neurons characterized by the D1 receptor second messenger DARPP-32. The low percentage of DARPP-32

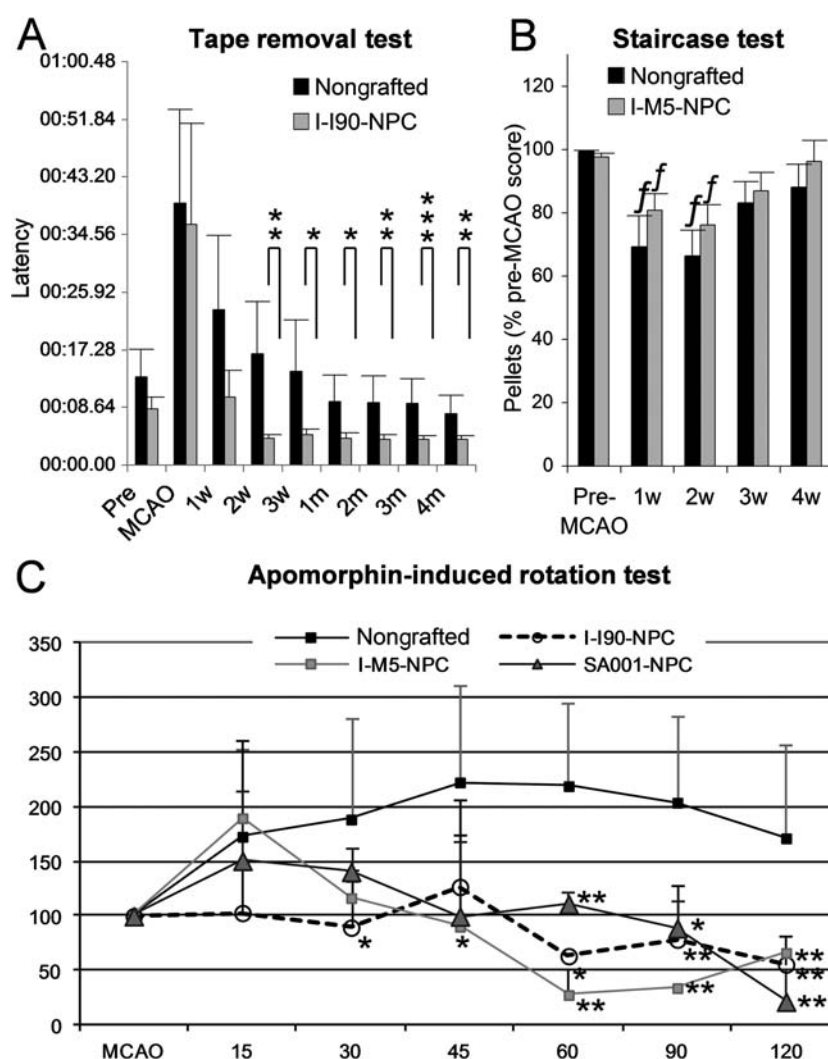


Figure 7. Transplantation improves functional recovery. (A) Adhesive removal test for I-I90-NPCs-grafted animals show a complete recovery from the second week postgrafting (w, week; m, month). (B) Staircase test for I-M5-NPC-grafted animals show rapid spontaneous recovery in the nongrafted group; w, week postgrafting. *f*, $p < 0.05$ compared to the pre-MCAO score in the corresponding group. (C) Apomorphin-induced rotation in nongrafted animals and animals grafted with NPC from I-M5, I-I90, and SA001. Scores are represented as percentage of MCAO baseline data. One-way ANOVA with Bonferroni–Dunn test for intergroups comparison at each experimental step. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$.

neurons observed in grafts can be attributed to the lack of particular commitment during NPC differentiation and might be improved by specific differentiation protocols.

The second requirement for cell replacement therapy is accurate reconstruction of disrupted pathways (13). The ability of human neural progenitors to extend axons into the adult rat brain was first described by Wictorin and collaborators after excitotoxic striatal lesion (51). Subsequent studies have histologically (19) and electrophysiologically (6,11,19) reported synaptic contacts between human NPCs and the adult rodent brain in stroke models. The possibility for human grafted neurons to form long-distance axonal projections is less documented

and controversial. On one hand, few retrogradely labeled axons were observed in cortical transplants after injection of a tracer into the thalamus (16). Limited projection from grafted cortical tissue and the underlying striatum was reported in a model of cortical ischemia (44). On the other hand, Gaillard et al. observed specific connections between murine homotopic nigral transplants and the host striatum in a model of Parkinson's disease (14) and from murine ESC-NPCs intracortical transplants to the host spinal cord (15). Reconstruction of the striatonigral loop was also achieved by simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (31). A major result of our study was the fact that grafted hiPSC-NPCs extended axons toward

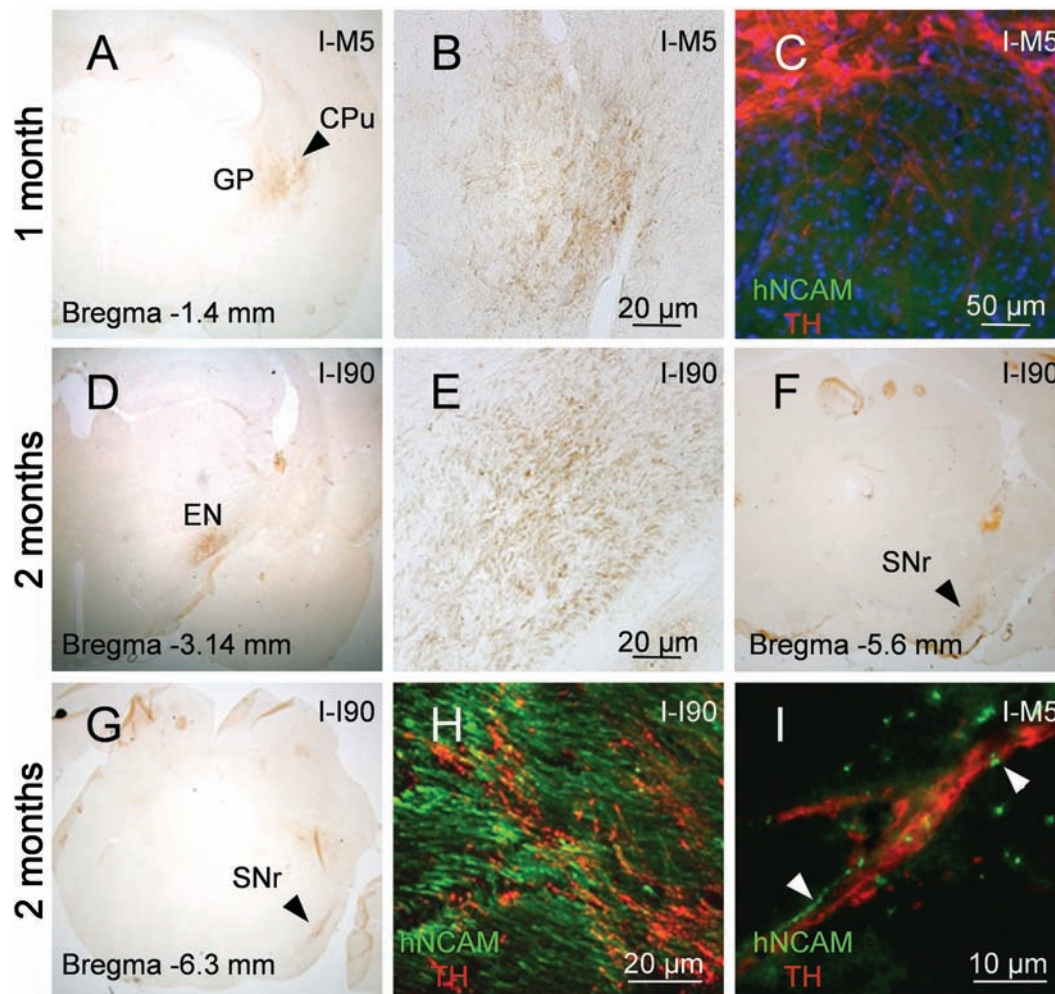


Figure 8. I-ShiPS-NPCs project axons into the host brain. (A, B) After 1 month, human fibers were seen in the host globus pallidus (GP). CPu, caudate putamen nucleus. (C) No hNCAM-labeled fibers were seen in the SN. (D–I) Graft-derived axonal elongation at 2 months. Axons are seen in the entopeduncular nucleus (D, E) and the SN (F, G) down to its caudalmost part (G). (H) Human axons intermingled with host TH-positive axons from the SN pars compacta at the entry of SN. (I) Graft-derived axons (green) in close apposition to dopaminergic neuron dendrites (red) in pars reticulata.

the remote host SN with great specificity. This suggests that hiPSC-NPCs have the potential to recognize their target over long distances in the adult postischemic brain. The molecular content of the dialogue that establishes between grafted cells and the recipient brain remains to be understood. It might relate to the particularly prone-to-remodeling state of the poststroke brain (32). Alternatively, axonal extension in a xenograft situation might result from an insensibility of human axons to the adult rat brain inhibitory molecules (41) that would normally prevent the growth of rat axons. Reciprocity of this dialogue was suggested by the rapid sprouting of host-derived TH fibers into the grafts. The importance of host afferents in graft development has been emphasized in previous studies (12,29) and could have played a role in guiding the terminal differentiation of grafted neurons.

For cell replacement to be causally linked to restoration of impaired functions, a temporal relationship should have existed between the maturation of graft-derived GABAergic neurons in the host striatum and the kinetics of functional recovery. However, improvements of sensorimotor functions in the adhesive removal test occurred very rapidly and were temporally dissociated from both the maturation of GABAergic neurons in grafts and axonal projections to host target areas, which occurred weeks later. This temporal discrepancy suggests the existence of mechanisms unrelated to the maturation and integration of grafted cells. Non cell-autonomous mechanisms have been evoked as major mediators of SCs effects in stroke, including with NPCs (5,26,35,36,38,43,53). They are commonly attributed to the release, by immature exogenous cells,

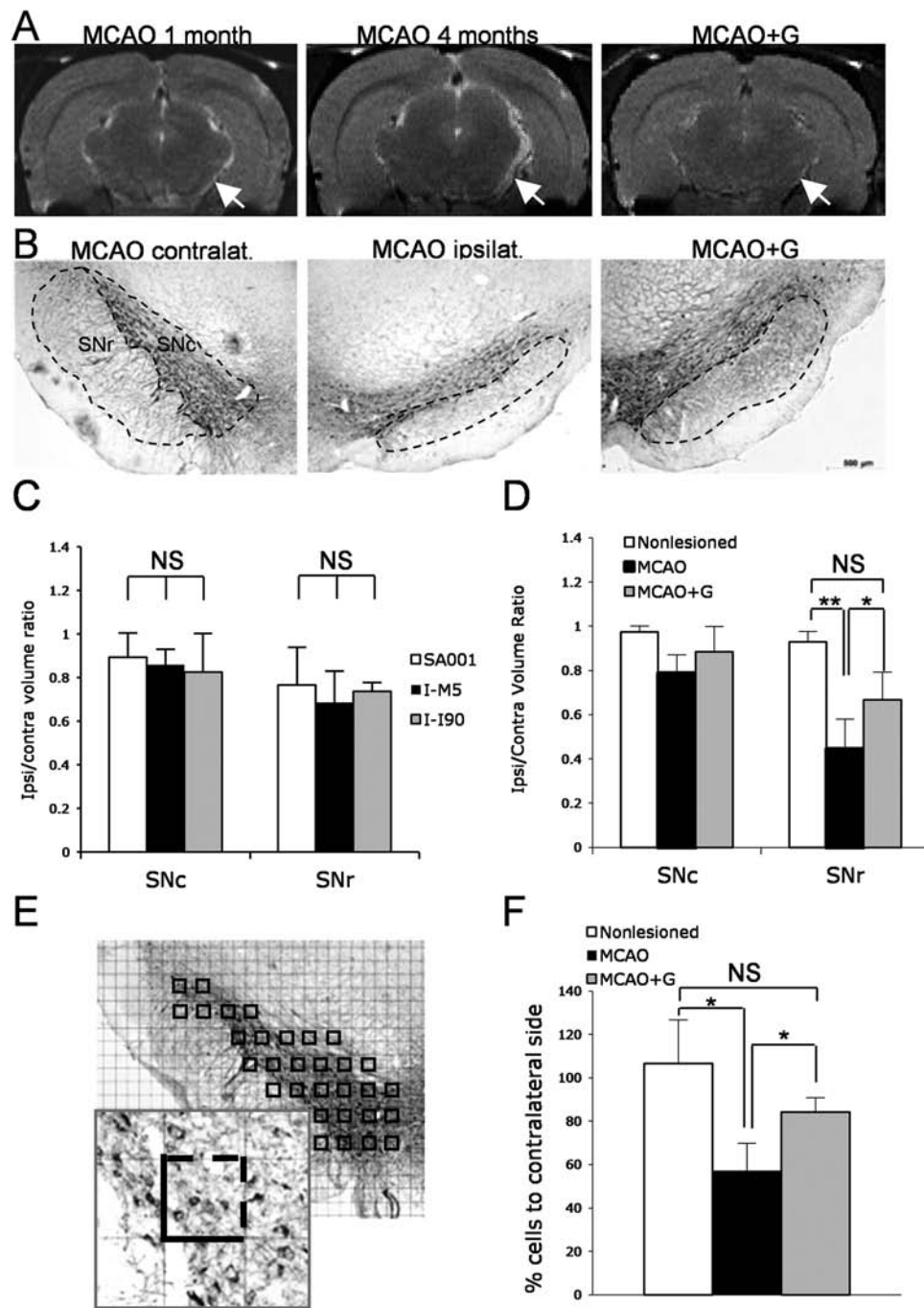


Figure 9. Transplantation prevents substantia nigra atrophy. (A) T2 weighted MRI shows a global atrophy of the right side (arrows) in a lesioned animal (MCAO) at 1 and 4 months post-MCAO, which is less conspicuous in grafted animals (MCAO+G; example of I-I90-NPCs graft). (B) Anti-TH immunohistochemistry in SN pars compacta (SNc) and pars reticulata (SNr) at 1 month. Delineation shows the area for volumetric measures. (C) Quantification of SNr and SNc volumes in animals grafted with the three lines-NPCs confirmed the homogeneity of the groups. (D) Grafting (MCAO+G) significantly reduce SNr atrophy induced by MCAO. $*p < 0.05$. (E) Illustration of the sampling for TH neuron counting. Insert shows the counting frame. Counts included neurons with visible nucleus present inside the frame or crossing the dashed line. (F) Quantification of TH-positive neurons in SNc, showing stroke-induced reduction and protection by grafting. One-way ANOVA with Bonferroni–Dunn test, $*p < 0.05$. NS, nonstatistically significant.

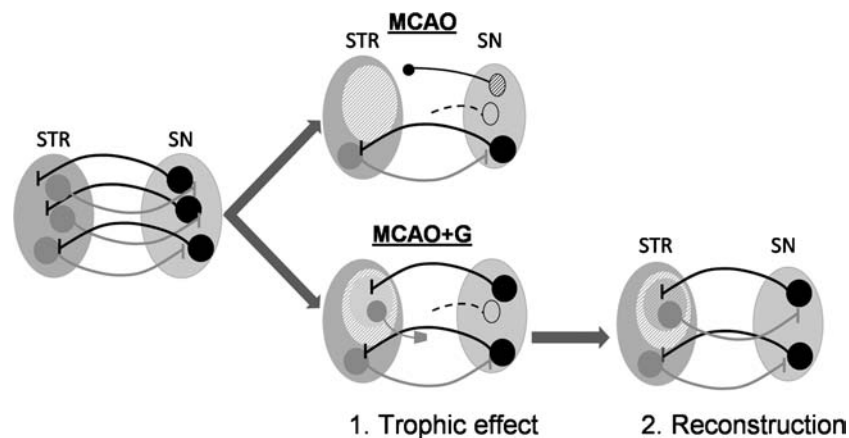


Figure 10. Suggested effects of hiPSC-NPCs grafted into the postischemic brain. Reciprocal connections link the substantia nigra (SN) to the striatum (STR). Stroke (MCAO) depletes the STR neuronal populations and deprives SN of both afferent and target cells, resulting in atrophy and partial cell death (no graft). Grafting (MCAO+Graft) firstly rescues the atrophy by providing SN striatal afferents with new targets and by promoting SN axonal sprouting (1. Trophic effect). Secondly, with maturation of transplanted cells, reconstruction of the STR-SN loop allows maintenance of functions (2. Reconstruction).

of neuroprotective, antioxidant, and anti-inflammatory molecules that can both limit degeneration and improve the structural reorganization of the post-stroke brain. The characterization of this dialogue in our paradigm deserves further investigations.

In contrast with the rapid recovery of sensorimotor functions, improvements of motor ability in the apomorphin-induced test established slowly. Apomorphin is an agonist of dopaminergic receptors that requires maturation of striatal neurons to be effective. The time course of motor recovery in this test nicely corresponded to the maturation of DARPP-32 neurons and to axonal projection to the SN.

Secondary alteration in areas functionally related to the lesion site after stroke has been described in patients (50) and animal models (33,46) and greatly contributes to long-term functional impairments. The reduction of TH fibers in the striatum directly correlates with the atrophy of the SN (22), and striatal administration of trophic factors after lesion of SN axons protects against SN degeneration. In addition, intrastriatal grafting of mesenchymal SCs reduced the sensitivity of SN neurons to the toxicity of 6-hydroxydopamine (4,37), showing that SCs can exert a protective effect on SN neurons. We propose that the trophic effect exerted on host SN afferents by the graft was instrumental in promoting TH afferent sprouting into the graft and protecting the SN from atrophy, leading to rapid restoration of sensorimotor functions.

CONCLUSIONS

The driving force of current SC therapy research is to achieve a comprehensive understanding of the mechanisms by which transplanted cells restore lost functions.

So far, reported mechanisms include bystander effects unrelated to intracerebral integration of exogenous cells and effects that directly rely on this integration. Due to its pathogenic characteristics, stroke can uniquely benefit from this duality. In the acute phase, cell death and inflammation predominates and trophic, angiogenic, and/or anti-inflammatory actions can reduce the severity of infarction without cell engraftment. In contrast, the post-acute and chronic phases are times for intense axonal and synaptic reorganization that can be efficiently supported by integrated cells. As schematized in Figure 10, hiPSC-NPCs might act both rapidly with unspecific trophic effects and, secondarily, through integration and reconstruction of connections with host structures. A final step is needed before hiPSC-derived progenies enter the clinic, which relies on improvements of both the quality (to limit genetic and epigenetic modifications) and the availability of cells. The production of “patient-tailored” hiPSC, which could avoid transplant rejection, is a months-taking procedure and might not fit with the emergency requirements of stroke treatment. In contrast, the iPSC strategy allows the derivation of HLA-compatible cell banks that might provide the ideal cell source for cell replacement therapy or more generally SC therapy in stroke.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank C. André for teratoma formation and analysis, X. Nissan for qPCR, M. Feyeux for cell culture, C. Varela for karyotyping, N. Lefort for FACS, and A. Günther-Kern and I. Heinemann for animal surgery and staircase testing. This work was performed in and granted by the STEMS (“Preclinical analysis of stem cell therapy for stroke”) FP6 European project. It was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the grant 1M0538 from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Andrey, P.; Maurin, Y. Free-D: An integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. *J. Neurosci. Methods* 145(1–2):233–244; 2005.
- Arvidsson, A.; Kirik, D.; Lundberg, C.; Mandel, R. J.; Andberg, G.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Elevated GDNF levels following viral vector-mediated gene transfer can increase neuronal death after stroke in rats. *Neurobiol. Dis.* 14(3):542–556; 2003.
- Bang, O. Y.; Lee, J. S.; Lee, P. H.; Lee, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 57(6):874–882; 2005.
- Blandini, F.; Cova, L.; Armentero, M. T.; Zennaro, E.; Levandis, G.; Bossolasco, P.; Calzarossa, C.; Mellone, M.; Giuseppe, B.; Delilieri, G. L.; Polli, E.; Nappi, G.; Silani, V. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplant.* 19(2):203–217; 2010.
- Bliss, T. M.; Andres, R. H.; Steinberg, G. K. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol. Dis.* 37(2):275–283; 2010.
- Buhneemann, C.; Scholz, A.; Bernreuther, C.; Malik, C. Y.; Braun, H.; Schachner, M.; Reymann, K. G.; Dihne, M. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129(Pt 12):3238–3248; 2006.
- Burns, T. C.; Verfaillie, C. M.; Low, W. C. Stem cells for ischemic brain injury: A critical review. *J. Comp. Neurol.* 515(1):125–144; 2009.
- Chambers, S. M.; Fasano, C. A.; Papapetrou, E. P.; Tomishima, M.; Sadelain, M.; Studer, L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27(3):275–280; 2009.
- Chen, S. J.; Chang, C. M.; Tsai, S. K.; Chang, Y. L.; Chou, S. J.; Huang, S. S.; Tai, L. K.; Chen, Y. C.; Ku, H. H.; Li, H. Y.; Chiou, S. H. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells Dev.* 19(11):1757–1767; 2010.
- Chopp, M.; Steinberg, G. K.; Kondziolka, D.; Lu, M.; Bliss, T. M.; Li, Y.; Hess, D. C.; Borlongan, C. V. Who's in favor of translational cell therapy for stroke: STEPS forward please? *Cell Transplant.* 18(7):691–693; 2009.
- Daadi, M. M.; Li, Z.; Arac, A.; Grueter, B. A.; Sofilos, M.; Malenka, R. C.; Wu, J. C.; Steinberg, G. K. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol. Ther.* 17(7):1282–1291; 2009.
- Defontaine, B.; Peschanski, M.; Onteniente, B. Host dopaminergic afferents affect the development of DARPP-32 immunoreactivity in transplanted embryonic striatal neurons. *Neuroscience* 48(4):857–869; 1992.
- Dihne, M.; Hartung, H. P.; Seitz, R. J. Restoring neuronal function after stroke by cell replacement: Anatomic and functional considerations. *Stroke* 42(8):2342–2350; 2011.
- Gaillard, A.; Decressac, M.; Frappe, I.; Fernagut, P. O.; Prestoz, L.; Besnard, S.; Jaber, M. Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol. Dis.* 35(3):477–488; 2009.
- Gaillard, A.; Prestoz, L.; Dumartin, B.; Cantereau, A.; Morel, F.; Roger, M.; Jaber, M. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 10(10):1294–1299; 2007.
- Gonzalez, M. F.; Sharp, F. R.; Loken, J. E. Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats: Reciprocal connections with host thalamus demonstrated with WGA-HRP. *Exp. Neurol.* 99(1):154–165; 1988.
- Gore, A.; Li, Z.; Fung, H. L.; Young, J. E.; Agarwal, S.; Antosiewicz-Bourget, J.; Canto, I.; Giorgetti, A.; Israel, M. A.; Kiskinis, E.; Lee, J. H.; Loh, Y. H.; Manos, P. D.; Montserrat, N.; Panopoulos, A. D.; Ruiz, S.; Wilbert, M. L.; Yu, J.; Kirkness, E. F.; Izpisua Belmonte, J. C.; Rossi, D. J.; Thomson, J. A.; Eggan, K.; Daley, G. Q.; Goldstein, L. S.; Zhang, K. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):63–67; 2011.
- Hicks, A.; Schallert, T.; Jolkonen, J. Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke. *Cell Stem Cell* 5(2):139–140; 2009.
- Ishibashi, S.; Sakaguchi, M.; Kuroiwa, T.; Yamasaki, M.; Kanemura, Y.; Shizuko, I.; Shimazaki, T.; Onodera, M.; Okano, H.; Mizusawa, H. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J. Neurosci. Res.* 78(2):215–223; 2004.
- Kawai, H.; Yamashita, T.; Ohta, Y.; Deguchi, K.; Nagotani, S.; Zhang, X.; Ikeda, Y.; Matsuura, T.; Abe, K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30(8):1487–1493; 2010.
- Kim, K.; Doi, A.; Wen, B.; Ng, K.; Zhao, R.; Cahan, P.; Kim, J.; Aryee, M. J.; Ji, H.; Ehrlich, L. I.; Yabuuchi, A.; Takeuchi, A.; Cunniff, K. C.; Hongguang, H.; McKinney-Freeman, S.; Naveiras, O.; Yoon, T. J.; Irizarry, R. A.; Jung, N.; Seita, J.; Hanna, J.; Murakami, P.; Jaenisch, R.; Weissleder, R.; Orkin, S. H.; Weissman, I. L.; Feinberg, A. P.; Daley, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285–290; 2010.
- Kirik, D.; Rosenblad, C.; Bjorklund, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* 152(2):259–277; 1998.
- Kiskinis, E.; Eggan, K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* 120(1):51–59; 2010.
- Kondziolka, D.; Steinberg, G. K.; Wechsler, L.; Meltzer, C. C.; Elder, E.; Gebel, J.; Decesare, S.; Jovin, T.; Zafonte, R.; Lebowitz, J.; Flickinger, J. C.; Tong, D.; Marks, M. P.; Jamieson, C.; Luu, D.; Bell-Stephens, T.; Teraoka, J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: A phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* 103(1):38–45; 2005.
- Lapillonne, H.; Kobari, L.; Mazurier, C.; Tropel, P.; Giarratana, M. C.; Zanella-Cleon, I.; Kiger, L.; Wattenhofer-Donze, M.; Puccio, H.; Hebert, N.; Francina, A.; Andreu, G.; Viville, S.; Douay, L. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: Perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95(10):1651–1659; 2010.
- Lee, J. P.; Jeyakumar, M.; Gonzalez, R.; Takahashi, H.; Lee, P. J.; Baek, R. C.; Clark, D.; Rose, H.; Fu, G.; Clarke, J.; McKercher, S.; Meerloo, J.; Muller, F. J.; Park, K. I.; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Schwartz, P.; Tong, G.; Wenger, D.; Lipton, S. A.; Seyfried, T. N.; Platt, F. M.; Snyder, E. Y. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat. Med.* 13(4):439–447; 2007.

27. Lindvall, O.; Kokaia, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation? *J. Clin. Invest.* 120(1):29–40; 2010.
28. Lister, R.; Pelizzola, M.; Kida, Y. S.; Hawkins, R. D.; Nery, J. R.; Hon, G.; Antosiewicz-Bourget, J.; O'Malley, R.; Castanon, R.; Klugman, S.; Downes, M.; Yu, R.; Stewart, R.; Ren, B.; Thomson, J. A.; Evans, R. M.; Ecker, J. R. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):68–73; 2011.
29. Liu, F. C.; Dunnett, S. B.; Graybiel, A. M. Influence of mesostriatal afferents on the development and transmitter regulation of intrastriatal grafts derived from embryonic striatal primordia. *J. Neurosci.* 12(11):4281–4297; 1992.
30. Longa, E. Z.; Weinstein, P. R.; Carlson, S.; Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20(1):84–91; 1989.
31. Mendez, I.; Sadi, D.; Hong, M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J. Neurosci.* 16(22):7216–7227; 1996.
32. Moskowitz, M. A.; Lo, E. H.; Iadecola, C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67(2):181–198; 2010.
33. Nakane, M.; Teraoka, A.; Asato, R.; Tamura, A. Degeneration of the ipsilateral substantia nigra following cerebral infarction in the striatum. *Stroke* 23(3):328–332; 1992.
34. Nakatsuji, N.; Nakajima, F.; Tokunaga, K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat. Biotechnol.* 26(7):739–740; 2008.
35. Onteniente, B.; Polentes, J. Regenerative medicine for stroke—are we there yet? *Cerebrovasc. Dis.* 31(6):544–551; 2011.
36. Ramos-Cabrera, P.; Justicia, C.; Wiedermann, D.; Hoehn, M. Stem cell mediation of functional recovery after stroke in the rat. *PLoS One* 5(9):e12779; 2010.
37. Rosenblad, C.; Kirik, D.; Devaux, B.; Moffat, B.; Phillips, H. S.; Bjorklund, A. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur. J. Neurosci.* 11(5):1554–1566; 1999.
38. Sanberg, P. R.; Eve, D. J.; Willing, A. E.; Garbuzova-Davis, S.; Tan, J.; Sanberg, C. D.; Allickson, J. G.; Cruz, L. E.; Borlongan, C. V. The treatment of neurodegenerative disorders using umbilical cord blood and menstrual blood-derived stem cells. *Cell Transplant.* 20(1):85–94; 2011.
39. Schallert, T.; Woodlee, M. T.; Fleming, S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Kriegelstein, J.; Klumpp, S., eds. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart, Germany: Medpharm Scientific Publishers; 2012:201–216.
40. Schmid-Elsaesser, R.; Zausinger, S.; Hungerhuber, E.; Baethmann, A.; Reulen, H. J. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29(10):2162–2170; 1998.
41. Schwab, M. E.; Kapfhammer, J. P.; Bandtlow, C. E. Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:565–595; 1993.
42. Seminatore, C.; Polentes, J.; Ellman, D.; Kozubenko, N.; Itier, V.; Tine, S.; Tritschler, L.; Brenot, M.; Guidou, E.; Blondeau, J.; Lhuillier, M.; Bugi, A.; Aubry, L.; Jendelova, P.; Sykova, E.; Perrier, A. L.; Finsen, B.; Onteniente, B. The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke* 41(1):153–159; 2010.
43. Shimada, I. S.; Spees, J. L. Stem and progenitor cells for neurological repair: Minor issues, major hurdles, and exciting opportunities for paracrine-based therapeutics. *J. Cell. Biochem.* 112(2):374–380; 2011.
44. Sorensen, J. C.; Grabowski, M.; Zimmer, J.; Johansson, B. B. Fetal neocortical tissue blocks implanted in brain infarcts of adult rats interconnect with the host brain. *Exp. Neurol.* 138(2):227–235; 1996.
45. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676; 2006.
46. Tamura, A.; Kirino, T.; Sano, K.; Takagi, K.; Oka, H. Atrophy of the ipsilateral substantia nigra following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 510(1):154–157; 1990.
47. Tang, Y.; Yasuhara, T.; Hara, K.; Matsukawa, N.; Maki, M.; Yu, G.; Xu, L.; Hess, D. C.; Borlongan, C. V. Transplantation of bone marrow-derived stem cells: A promising therapy for stroke. *Cell Transplant.* 16(2):159–169; 2007.
48. Tchieu, J.; Kuoy, E.; Chin, M. H.; Trinh, H.; Patterson, M.; Sherman, S. P.; Aimiwu, O.; Lindgren, A.; Hakimian, S.; Zack, J. A.; Clark, A. T.; Pyle, A. D.; Lowry, W. E.; Plath, K. Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* 7(3):329–342; 2010.
49. van Gijn, J.; Dennis, M. S. Issues and answers in stroke care. *Lancet* 352 Suppl 3:III23–27; 1998.
50. Volpe, B. T.; Blau, A. D.; Wessel, T. C.; Saji, M. Delayed histopathological neuronal damage in the substantia nigra compacta (nucleus A9) after transient forebrain ischaemia. *Neurobiol. Dis.* 2(2):119–127; 1995.
51. Wictorin, K.; Ouimet, C. C.; Bjorklund, A. Intrinsic organization and connectivity of intrastriatal striatal transplants in rats as revealed by DARPP-32 immunohistochemistry: Specificity of connections with the lesioned host brain. *Eur. J. Neurosci.* 1(6):690–701; 1989.
52. Yu, J.; Vodyanik, M. A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G. A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; Slukvin, I.; Thomson, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917–1920; 2007.
53. Zhang, Z. G.; Chopp, M. Neurorestorative therapies for stroke: Underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol.* 8(5):491–500; 2009.

Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media

Karolina Turnovcova^{1,2}, Katerina Ruzickova¹, Vaclav Vanecek^{1,2},
Eva Sykova^{1,2} and Pavla Jendelova^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, and ²Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, 2nd Medical Faculty, Prague, Czech Republic

Background aims

Human mesenchymal stromal cells (hMSC) are a promising tool for future clinical application, but their use requires rapid cell expansion in media suitable for clinical use. Therefore, we tested the influence of several culture media on colony formation, population doubling (PD) time, cell cycle and surface marker expression.

Methods

hMSC isolated from human bone marrow (BM) obtained from healthy donors were seeded and expanded in different culture media: α -minimum essential medium (MEM) supplemented with 2.5%, 5%, 10% or 20% fetal bovine serum (FBS), 5% or 10% human cord blood serum (hCBS), 5% or 10% human blood serum from AB adult donors (hABS), or mesenchymal stem cell growth medium (MSCGMTM). The number, diameter and total area of the colonies formed and PD time were determined, and the cell cycle and 16 surface markers were analyzed.

Results

Colony-forming efficiency was best in α -MEM/hCBS and α -MEM/hABS, good in MSCGM and worst in α -MEM/FBS. The shortest

PD time was achieved in media enriched with human sera or MSCGM, while the time was increased in α -MEM/FBS. The largest proliferating fraction was seen in MSCGM followed by media enriched with human sera; the fraction was smallest in α -MEM/FBS. Staining for CD34, CD45, CD235a and CD271 was negative, while that for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and human leukocyte antigen (HLA)-A, -B, -C was positive in all media tested. Media with human serum did not adversely affect the differentiation potential of hMSC, and differentiation into osteoblasts was enhanced.

Conclusions

The choice of serum influences hMSC expansion and cell properties; α -MEM supplemented with hABS seems to be a promising candidate for clinical use.

Keywords

cell cycle, cell differentiation, cell-surface antigens, clinical trials, colony-forming units, population doubling time.

Introduction

Human mesenchymal stromal cells (hMSC) are a promising tool for future clinical application. hMSC are non-hematopoietic stem cells isolated from adult tissues such as bone marrow (BM), adipose tissue, dental pulp and peripheral blood. hMSC are multipotent, adherent cells with the capacity to differentiate into various cell lines, including osteoblasts, chondroblasts and adipoblasts.

In the case of severe tissue ischemia or damage, mesenchymal stromal cells (MSC) can be attracted to the damaged site, where they influence repair and regenerative processes. MSC can be mobilized from the marrow or expanded in culture and delivered to the damaged site by direct or systemic injection [1]. An important property of MSC is their production of a broad spectrum of bioactive macromolecules that establish a regenerative microenvironment in injured

tissue and exert potent immunosuppressive and anti-inflammatory effects. MSC release regulatory cytokines and paracrine factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), beta fibroblast growth factor (β FGF), interleukin (IL)-6, placental growth factor (PIGF), monocyte chemoattractant protein 1 [2], granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), IL-6, IL-11 and leukemia inhibitory factor (LIF) [3]; in addition, MSC can modulate the host immune system [4]. They are thought to promote functional recovery and induce the survival and regeneration of numerous damaged tissues and organs, such as neural tissue (by the production of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor) [5], inflamed bowel tissue [6] and injured skin [2]; they can also modulate hepatocellular death and liver regeneration in rats [7]. Current clinical trials in humans are based on the immunosuppressive, immunomodulatory and trophic properties of hMSC, as well as on their putative capacity to differentiate into specific cells in the target tissue; a brief overview of the past, present and future of stem cell-based therapies in clinical practice is provided in the review of Bajada *et al.* [8]. hMSC have been investigated for the treatment of skeletal diseases and traumas such as osteogenesis imperfecta, osteodysplasia, distal tibial fracture, multi-trauma, kidney failure, lupus erythematosus, liver diseases, heart failure, coronary heart disease, including myocardial infarct, and other pathologies. Information about current clinical trials can be found at the website <http://www.clinicaltrials.gov>, accessed on August 12, 2009 under the keywords 'human mesenchymal stem cells'. In the majority of experiments, hMSC are isolated and expanded in medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) [9]. However, a risk of prion transmission is associated with using FBS, as is contamination by atypical animal pestiviruses in bovine serum products [10] and the risk of developing an immune response to FBS in human patients [11–13]. To overcome these problems, the use of autologous human sera is recommended [14]. However, collecting a sufficient volume of autologous serum could be, in the case of serious injury or disease, practically impossible. Also, the application of hMSC in clinical medicine requires not only rapid cell expansion in a safe medium suitable for clinical use, but also that the cells should retain their surface markers and physiologic properties.

Growing research interest focused on hMSC has led to several ambiguities and inconsistencies in defining

mesenchymal stromal cells, which are also often termed mesenchymal stem cells. To clarify the definition of hMSC, the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) issued a position statement that recommended that the term hMSC should refer to plastic-adherent, spindle-shaped or fibroblast-like cells forming colonies before the first trypsinization in culture. hMSC cultivated *in vitro* should express CD73, CD90 and CD105 but not human leukocyte antigen (HLA)-DR, CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α or CD19 [15]; eventually, they should also express CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD71, CD106, CD120, CD124, CD166 and major histocompatibility complex (MHC) I [9,16–20].

In this study, we tested the influence of several culture media on cell expansion and cell properties. We focused on the colony-forming properties, population doubling time (PD), cell cycle and expression of surface markers.

Methods

Cell cultures

Human MSC were obtained by BM aspiration from 25 healthy 19–41-year-old donors; the mononuclear fraction containing hMSC was collected using Ficoll density-gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsalla, Sweden; www.gelifesciences.com/cellprep). Briefly, 3 mL Ficoll was layered with 2 mL marrow aspirate mixed with 2 mL phosphate-buffered saline (PBS) in a centrifuge tube and centrifuged at 400 *g* for 40 min. The mononuclear layer was then transferred to a sterile tube [21]. The cell suspension was seeded on 10-cm Petri dishes at different seeding densities, according to the type of experiment (see below). The hMSC were isolated based on their selective adherence to the plastic surface [22], then expanded in nine different culture media: α -minimum essential medium (α -MEM; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 2.5%, 5%, 10% or 20% FBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 5% or 10% human cord blood serum (hCBS; Stem Cell Pro Ltd, Prague, Czech Republic), 5% or 10% allogeneic human blood serum from AB adult donors (hABS; from the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, prepared as described below), containing 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (P/S), or mesenchymal stem cell growth medium (MSCGMTM; Lonza/Cambrex, Basel, Switzerland). The cells were not pooled, i.e. each sample was tested separately in triplicate.

Cell isolation was done in the same media as the expansion, so the cells were never exposed to more than one type of serum. Non-adherent cells were removed after 3 days, then the media were changed twice per week. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. All tissue culture flasks and dishes were obtained from TPP (Trasadingen, Switzerland; <http://www.tpp.ch>).

Human sera preparation

The sera for cultivation were prepared from the blood of healthy adult AB donors. The sera were prepared within 72 h of blood withdrawal. The blood was collected into anti-coagulant-free glass flasks and allowed to clot, then centrifuged and the serum layer removed. The collected sera were frozen in flasks, then thawed, pooled, aliquoted and stored at -20°C. Thus, before being used for cultivation, the blood samples were frozen and thawed twice. Before media preparation, the serum was filtered through a 0.22-µm PES membrane syringe filter (TPP).

Colony-forming properties and PD

After Ficoll density-gradient centrifugation, a cell suspension containing 1×10^6 mononuclear cells was seeded on 10-cm Petri dishes, i.e. *c.* 1300 cells/cm². After 2 weeks of cultivation, the hMSC colonies were stained with 0.5% crystal violet. The colony-forming properties were assessed by counting colonies with a diameter >2 mm and calculating the total areas of the colonies.

For assessing the PD time, cells were detached after forming large colonies and plated at a density of 150 cells/cm² on 3.5-cm Petri dishes. Five circles (20 mm² each) were marked on the bottom of each seeded Petri dish. The number of hMSC was counted in those five circles in each dish for 4 consecutive days. We calculated the average value of cell propagation (F) as the number of cells found in the circles divided by the number of cells found in the circles on the previous day in the same dish. The PD time between any two consecutive days was therefore $PD = 2/F \times \text{time}$ in hours between consecutive counts of the cell numbers in the same dish. The average PD time over the course of the 4-day experiment was then calculated for each replicate as $PD_{1-2} + PD_{2-3} + PD_{3-4/3} = PD$.

Cell cycle

Cells were seeded at 5000 cells/cm² on 10-cm Petri dishes, cultivated for another week and then detached with

trypsin/ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA). The cell suspension was fixed and permeabilized in 70% ethanol overnight in the dark at 4°C. DNA was stained with propidium iodide/RNase staining buffer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>) in a volume of 500 µl (containing 10⁶ cells) for 15 min at room temperature, then washed in PBS. DNA content was analyzed on a FACSAria flow cytometer using FACSDiVa Software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>).

Cell differentiation

To induce chondrogenesis, cells were harvested, transferred to polypropylene tubes and differentiated into chondrocytes in pellet cultures (250 000 cells/pellet) in serum-free medium containing α-MEM, dexamethasone (0.1 µM; Sigma, St Louis, MO, USA), human transforming growth factor-beta1 (hTGF-β1; 10 ng/mL; Millipore, Billerica, MA, USA), L-ascorbic acid (0.05 mM; Sigma), BDTM ITS+ universal culture supplement premix 1% (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and P/S (Gibco BRL, Paisley, UK). The tubes were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator and the medium was changed twice a week. Chondrogenic pellets were harvested after 20–22 days in culture. The pellets were fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin blocks and cut into 5-µm thick sections. Samples were then stained with Alcian blue using standard staining methods [23].

To induce adipogenic differentiation, the cells were seeded in six-well plates at a density of 10 000 cells/cm². Cells were grown to confluence and treated with medium containing α-MEM and either 10% FBS, 10% hABS or 10% hCBS, dexamethasone (1 µM), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (0.5 mM; Sigma), indomethacine (0.1 mM; Sigma), insulin (10 µg/mL; Sigma) and P/S. The medium was changed twice a week. After 10 days the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Oil Red [23].

To induce osteogenesis, the cells were seeded in six-well plates at a density of 3000 cells/cm². Cells were allowed to adhere for 24 h, then osteogenic medium containing α-MEM and either 10% FBS, 10% hABS or 10% hCBS, dexamethasone (0.1 µM), β-glycerophosphate (10 mM; Sigma), L-ascorbic acid (0.1 mM) and P/S was added. The medium was changed twice a week. After 7–20 days of culture, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Alizarin Red [23].

Expression of surface markers

After forming large colonies, cells were transferred into 150-cm² flasks and cultivated to achieve a sufficient number of cells (minimum 2.5×10^5 cells/sample, thus at least 6×10^6 cells in total). Therefore, we used cells from the third or fourth passage. When the cell monolayer reached its maximal confluence, the cells were detached with trypsin/EDTA, washed with PBS/2% bovine serum albumin (BSA) and labeled with the respective primary and secondary antibodies according to the manufacturer's recommendations for flow cytometry, then washed and fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C overnight prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, which was performed using a FACS Aria flow cytometer and FACSDiVa Software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA; <http://www.bdbiosciences.com>).

The following 16 primary antibodies were used: CD10 IgG1–fluorescein isothiocyanate (FITC), CD34 IgG1–FITC, CD105 IgG2a–Dyomics 647, HLA-DR+DP IgG2a–FITC (Exbio Antibodies, Vestec, Czech Republic; <http://www.exbio.cz>), CD29 IgG1–phycoerythrin (PE), CD44 IgG2b–FITC, CD49a IgG1–PE, CD71 IgG2a–PE, CD73 IgG1–PE, CD90 IgG1–FITC, CD271 IgG1–PE, HLA-A, -B, -C IgG1κ–FITC (BD Pharmingen; <http://www.bdbiosciences.com>), CD45 IgG1–PE and cyanine, i.e. IgG1–PE–cyanine 5 (Cy5), CD61/51 IgG1–PE, CD235a IgG1–PE (Dako, Glostrup, Denmark; <http://www.dako.com>) and unconjugated anti-fibroblast surface marker IgM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; <http://www.sigmaaldrich.com>). Anti-mouse IgM–FITC (Exbio Antibodies, Vestec, Czech Republic; <http://www.exbio.cz>) was used as a secondary antibody in conjunction with anti-fibroblast surface marker. Isotype controls were purchased from Dako: IgG1–FITC, IgG1–PE, IgG1–PE–Cy5, IgG2a–PE and IgG2b–FITC. At least 10 000 stained cells were acquired, and the gates were set so that no more than 1% of the cells were positive when stained with the isotype controls.

Statistical analysis

The numbers of colonies, PD times and cell cycle were evaluated using a one-way ANOVA, and the results were considered significant when $P < 0.05$. The data are expressed as mean \pm SE, and the correlation coefficient between PD time and cell cycle was calculated.

Results

Defining the hMSC

To meet the criteria of the ISCT, we characterized our cells, grown in standard culture conditions (in 10% FBS),

as expressing CD90, CD105 and CD73 and negative for CD45, CD34, CD11b, CD19 and HLA-DR+DP. In addition, we differentiated the cells into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts (Figure 1A–C) to confirm their multipotent potential.

Colony-forming properties and cell morphology

The colony-forming properties were assessed by counting those colonies with a diameter > 2 mm and calculating the diameters and total areas of the colonies after crystal violet staining. The number of colonies (Figure 2A) was significantly smaller only in 5% and 20% α -MEM/FBS sera; however, the diameter of the colonies (Figure 2B) was significantly larger in human ABS and MSCGM, followed by CBS and FBS. These findings indicated that the adherent cells from the mononuclear fraction could attach when cultivated in any of the tested media; however, their growth was much more pronounced in human sera and in a medium that is designed for MSC expansion. Generally, the colony-forming efficiency (total area of colonies; Figure 2C) was better in α -MEM/human sera and MSCGM than in α -MEM/FBS. A 10% concentration of FBS gave better results than 5% or 2.5%, while a 20% concentration of FBS was the worst. The P -value as calculated by ANOVA was < 0.001 , and pair-wise comparisons revealed significant differences between all α -MEM/FBS media and the other formulations.

Cells grown in human and cord blood sera were larger, with elongated cell bodies and processes, while cells cultured in FBS were smaller and had a flat, rounded shape (Figure 3A, B). When reaching confluency, MSC from human sera were uniformly spindle shaped, while MSC grown in FBS remained flat (Figure 3C, D) and never reached confluency.

Cell cycle and PD

Cell-cycle analyzes were performed by DNA content assessment. FACS analyzes revealed that, while a small population of cells were proliferating ($S + G2 + M = 10\%$), approximately 90% of the cells were in phase G1/G0. No significant differences among the tested media were found in terms of the fraction of proliferating cells (P by ANOVA > 0.05 ; Figure 4A). The size of the proliferating fraction among cells grown in any particular media showed high variability (data not shown). This variability was not donor age-dependent or media-dependent; most probably it

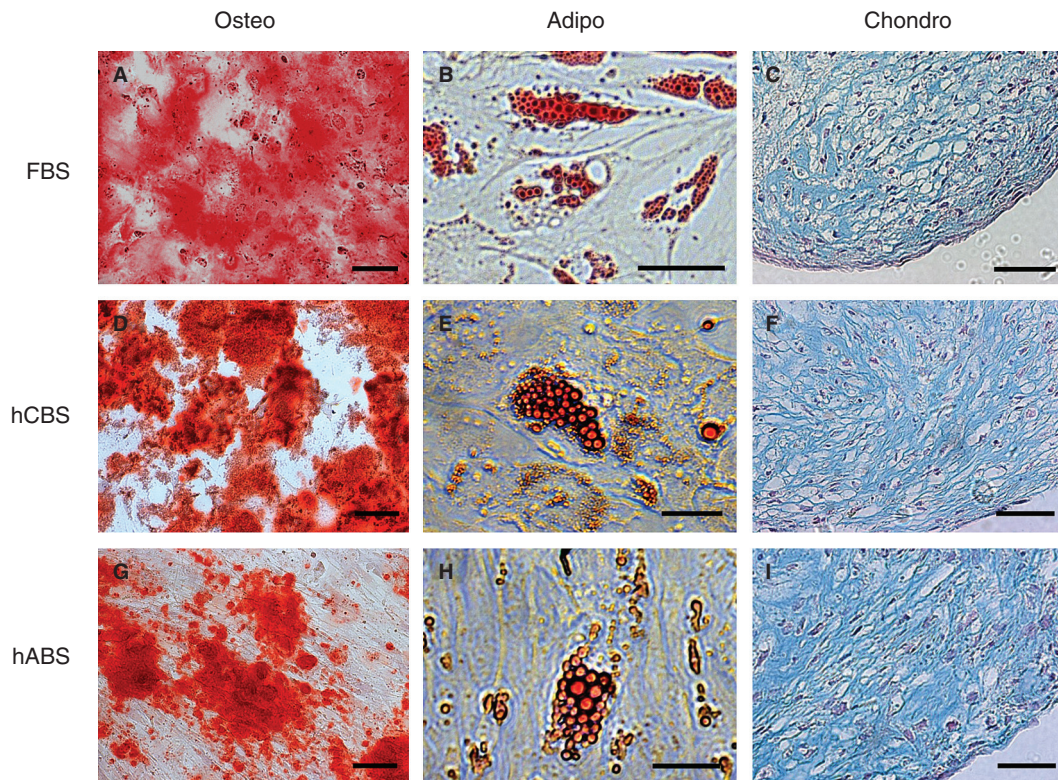


Figure 1. Differentiation capacity of hMSC. Differentiation into osteoblasts was demonstrated by calcium deposits stained with Alizarin Red. The cells were differentiated in the presence of 10% FBS (A), 10% hCBS (D) and 10% hABS (G). Differentiation into adipoblasts was confirmed by the formation of lipid droplets stained with Oil Red O. The cells were differentiated in the presence of 10% FBS (B), 10% hCBS (E) and 10% hABS (H). Differentiation into chondroblasts was demonstrated by staining with Alcian Blue. The differentiation medium was serum free but the cells were expanded in 10% α -MEM/FBS (C), 10% α -MEM/hCBS (F) and 10% α -MEM/hABS (I). Scale bars: A, D, G = 20 μ m; B, E, H = 10 μ m; C, F, I = 50 μ m.

resulted from the influence of several factors, such as time spent in culture, maximal confluency, etc. These results, in conjunction with the PD time, suggested that the number of proliferating cells remained the same but the cells were cycling faster, i.e. the cell cycle was shorter (Figure 4B).

The time required for PD varied between approximately 44 h (α -MEM/FBS) and 21 h (10% hABS). There was a certain donor variability in PD time; nonetheless, the cells always grew faster in human sera, and there was no correlation between the age of the donor and the PD time. One-way ANOVA revealed highly significant differences among the various media ($P < 0.01$; Figure 5).

Expression of 16 surface markers

The expression of CD10, CD29, CD34, CD44, CD45, CD49a, CD51/61, CD71, CD73, CD90, CD105, CD235a, CD271, anti-fibroblast surface marker, HLA-A, -B, -C and

HLA-DR + DP was tested in 5% and 10% α -MEM/hABS, 5% and 10% α -MEM/hCBS, 5% and 10% α -MEM/FBS and MSCGM. In 2.5% and 20% α -MEM/FBS, we did not obtain a sufficient number of cells to perform FACS analyzes. As expected, CD34, CD45, CD235a and CD271 were negative, while CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and HLA-A, -B, -C were positive in all tested media. Table I shows the relative intensity of surface marker expression in cells cultivated in the different media. In general, all positive markers were up-regulated in α -MEM/human sera and down-regulated in α -MEM/FBS; this down-regulation was increased with decreasing concentrations of FBS. In particular, differences in the expression of the adhesion markers CD29, CD44, CD51/61 and CD49a and the ubiquitous metabolic markers CD71, CD73 and CD10 were observed among media enriched with different sera.

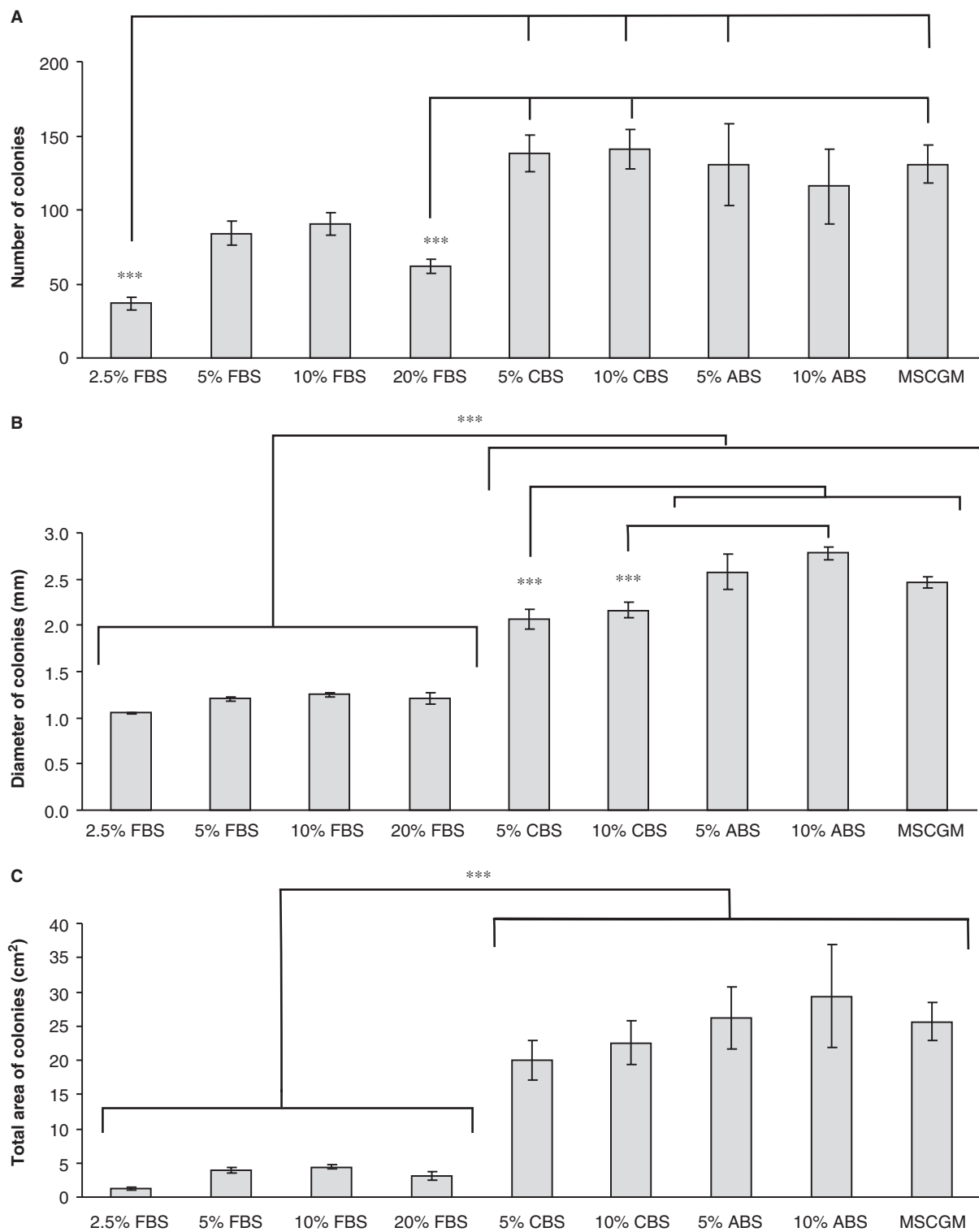


Figure 2. The number of colonies (A), diameter of colonies (B) and total area of colonies (C) grown in different culture media. Data are expressed as mean + SE. *** $P < 0.01$.

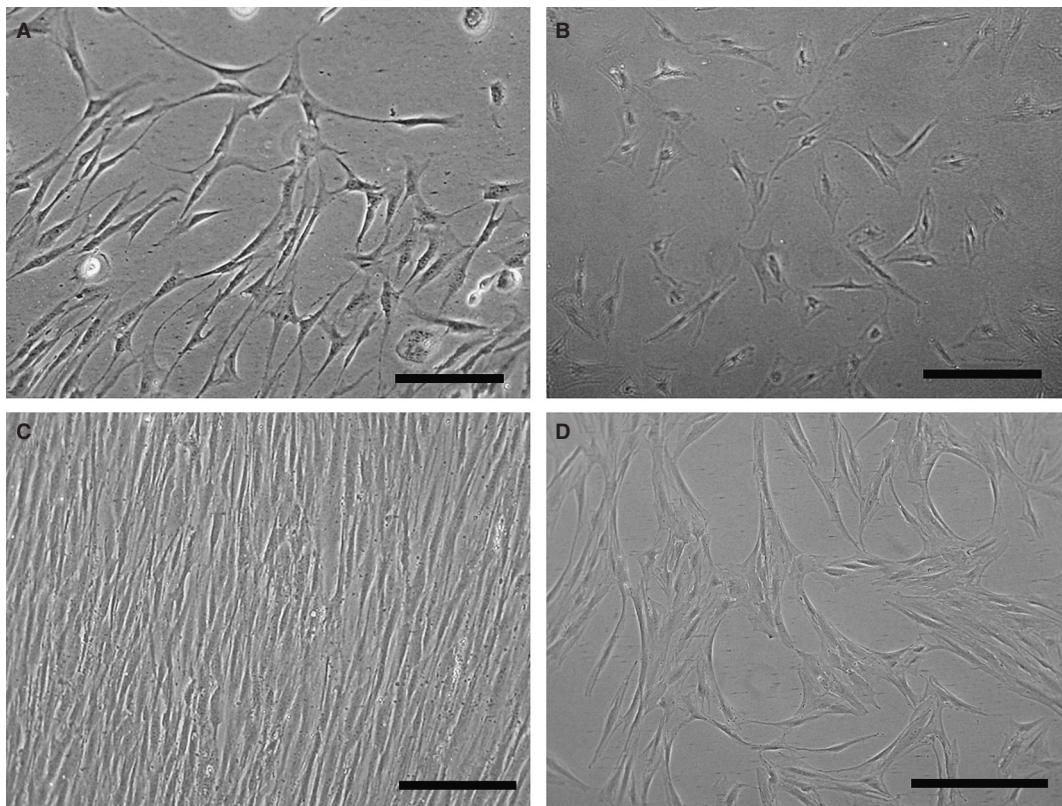


Figure 3. Morphology of hMSC grown in 10% α -MEM/hABS (A) and 5% α -MEM/FBS (B). Cells cultivated in media supplemented with human sera were spindle-shaped with long processes, in comparison with the small, flat cells found with a low concentration of FBS. hMSC in 10% α -MEM/hABS reached 100% confluency and were classified as spindle-shaped (C). Cells in 10% FBS were flat and did not reach confluency (D). Scale bars 100 μ m.

Cell differentiation

To prove that human serum does not have any negative influence on cell differentiation, we differentiated cells expanded in 10% hABS, 10% hCBS and 10% FBS serum into osteogenic, adipogenic and chondrogenic phenotypes. During adipogenic and osteogenic differentiation we used 10% hCBS and 10% hABS, respectively (Figure 1D, E, G, H). In chondrogenic differentiation medium, the serum was replaced by BDTM ITS+ universal culture supplement premix and was not used. Therefore, we only show the differentiation of cells expanded in human sera (Figure 1F, I). None of the human sera had a negative influence on the differentiation potential. The osteogenic potential was enhanced in 10% hCBS; robust calcium deposits were already visible 7 days after differentiation induction (Figure 1D). Similar results were achieved in hABS, where the differentiation into osteoblasts (Figure 1G) took only 11 days, compared with 20 days in 10% FBS (Figure 1A).

Discussion

We studied the growth properties and surface marker expression of human MSC cultivated in different media. The aim of our study was to assess various media in terms of their suitability for use in clinical applications. The choice of serum influences hMSC expansion and cell properties. Another important factor that influences the growth of MSC is the seeding density. Neuhuber *et al.* [24] showed, in experiments with rat mesenchymal stromal cells, that the growth patterns of rat MSC depend on the initial plating densities; a density of 200 cells/cm² was found to be the best. In our experiments, the seeding density of human MSC was 150/cm² for assessing the PD time. This density may be more suitable for the larger human MSC. Independent of the seeding density used in our study for any particular experiment, human sera (α -MEM/hABS) appeared to be the best alternative for the rapid expansion of hMHC. Our results are in agreement with those of Stute *et al.* [25], who tested the expansion and differentiation of hMSC in

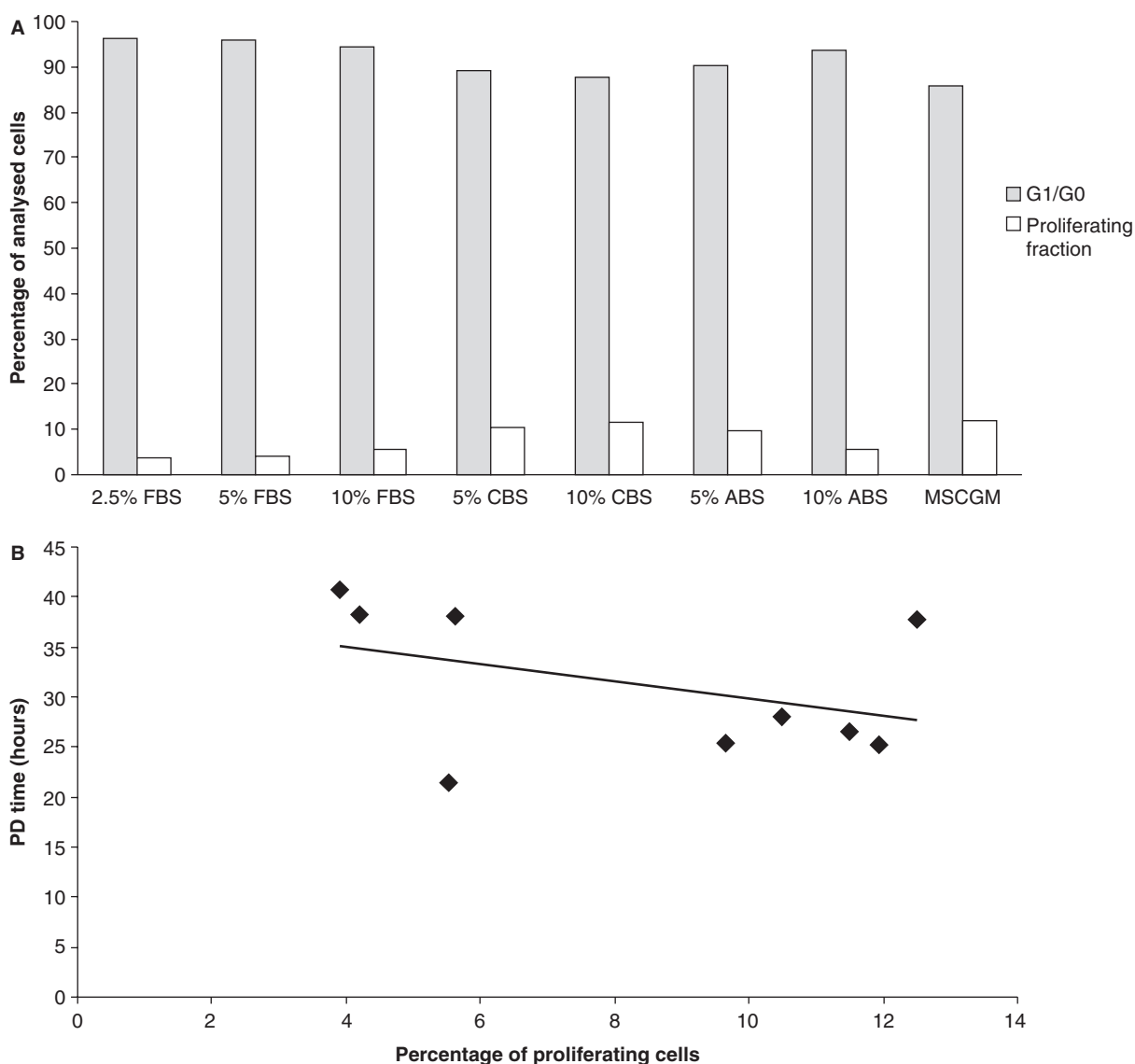


Figure 4. (A) Percentage of cells in different phases of the cell cycle, based on DNA content analysis. The largest proliferating fraction was seen in MSCGM (11.90%) followed by α -MEM/hCBS media (11.50% in 10% α -MEM/hCBS, 10.48% in 5% α -MEM/hCBS); the fraction was smaller in all α -MEM/FBS media and decreased with decreasing serum concentrations. (B) Correlation between PD time and percentage of cells in the S1G2/M phase; these results suggested a slight correlation between PD time and the size of the proliferating fraction, but the degree of correlation was not significant ($P=0.2$).

different concentrations of human autologous serum (hAS) versus FBS. The best proliferation rate and highest osteogenic potential was achieved using 10% hAS. However, the use of 10% FBS gave better results than low concentrations (3% and 1%) of hAS, revealing that a certain level of serum proteins is important for hMSC. In our experiments, a 5% concentration of hABS or hCBS still yielded better results than 10% FBS. Therefore, the threshold for human serum levels seems to be between 3% and 5%. In contrast

to the results of Shahdadfar *et al.* [9], the use of α -MEM/hABS gave the best results. These authors reported growth inhibition and short culture survival in allogeneic sera, but they used pooled human serum. It is likely that the growth inhibition observed in allogeneic cultures is caused by the amount of hemagglutinins present in pooled human sera. This problem can be overcome by using media enriched with autologous human sera, as the serum and cells are from the same blood group. We speculate that our positive results

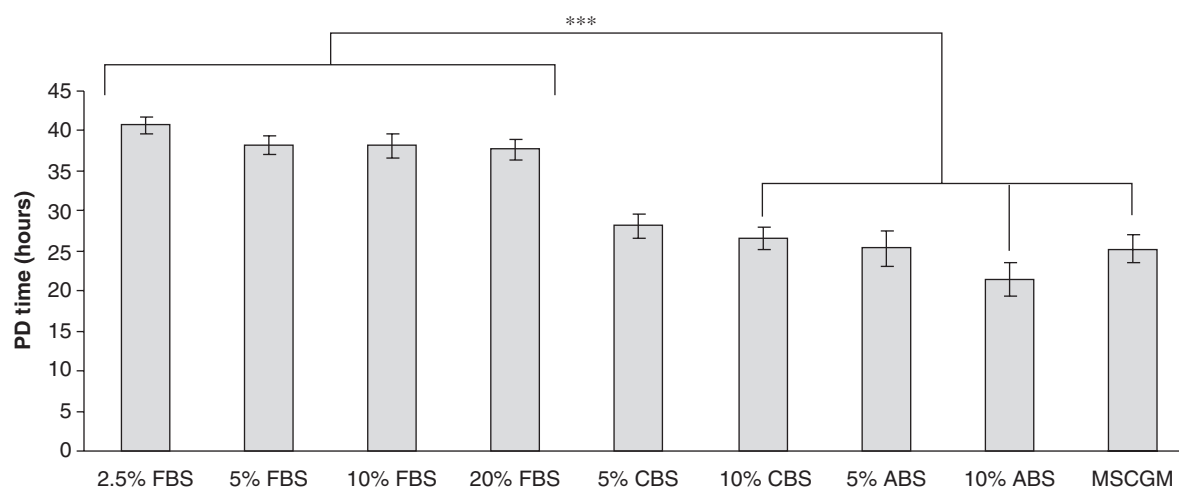


Figure 5. PD analysis of hMSC grown in different culture media. The PD times achieved in MSCGM and α -MEM enriched with human sera (ABS or CBS) were significantly faster than in α -MEM/FBS media. Data are expressed as mean + SE. *** $P < 0.01$.

obtained by culturing cells in media enriched with human AB serum or cord blood serum are because of the low concentration of these agglutinins in juvenile blood, in the case of cord blood serum, and the fact that AB blood lacks anti-A and anti-B hemagglutinins. In none of the human sera (ABS or CBS) did we find a significant difference in any

of the evaluated parameters that would depend on the chosen serum concentration. Currently, 10% FBS is the standard condition in which human MSC are expanded for research purposes. Various batches of FBS can differ in their growth support of hMSC. In our pilot studies we tried FBS standard and gold quality from PAA Laboratories, (Linz,

Table I. Expression of surface markers in hMSC.

Surface antigens	5% FBS	10% FBS	5% ABS	10% ABS	5% CBS	10% CBS	MSCGM
CD10 CALLA	—	—	+	+	+	+	+
CD29 Integrin, beta 1	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD34 Hematopoietic progenitor cell marker	—	—	—	—	—	—	—
CD44 Hyaluronate binding protein	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD45 Leukocyte common antigen	—	—	—	—	—	—	—
CD49a Integrin, alpha 1	—	—	+	++	+	+	+
CD61/51 Integrin α / β 3	—	—	++	++	+	+	+
CD71 Transferrin receptor	—	—	+++	++	++	++	++
CD73 5'-nucleotidase, ecto (NT5E)	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
CD90 Thy-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD105 Endoglin, part of the TGF- β receptor complex	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD235a Glycophorin A	—	—	—	—	—	—	—
CD271 NGFR	—	—	—	—	—	—	—
HLA-A, -B, -C	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
HLA-DR + DP	—	—	—	—	—	—	+
Fibroblast-specific antigen	—	—	—	+	—	—	+

—, no expression (<10%); +, weak expression (11–40%); ++, moderate expression (41–70%); +++, strong expression (>71%).

Austria) and certified serum from Gibco-Invitrogen. However, we did not find significant differences in the growth properties of hMSC. It might be possible to obtain better results in terms of growth properties if special batches, pre-screened to guarantee optimal growth, are used.

The study of cell kinetics revealed that the time required for PD was almost twice that for cells cultivated in α -MEM/FBS compared with cultivation in α -MEM/hABS. In contrast, cell-cycle analysis showed that only a small population of cells was proliferating (S + G2 + M); more than 90% of cells were in the G1/G0 phase. The number of dividing cells, as determined by DNA content analysis, varied within any particular media (data not shown). This suggests that the actual number of reproducing cells depends on other factors, such as time spent in culture or cell confluency. The cell cultures supplemented with hABS or MSCGM achieved greater expansion because of rapid cell division rather than an increase in the number of dividing cells. Our findings are in agreement with those of Conget *et al.* [17], who found that, although only a small fraction of cells (less than 10%) proliferated, this number of cells was sufficient for the maintenance of growth in culture. In experiments simulating clinical settings, starting from the same seeding density we were able to harvest in 3 weeks 6–10 times more cells/cm² in media enriched by human sera than in media with 10% FBS (data not shown). Rapid expansion can play a crucial role for patients in whom the cell transplantation window occurs during the acute phase of disease or injury.

MSC from BM can be cultured with a stable phenotype [18]. Unfortunately, there is no single marker that can characterize MSC. Pittenger *et al.* [18] describe them as uniformly positive for CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124 and negative for CD34, CD45 and CD14. The biotech company Lonza states in its technical datasheet for the characterization of MSC that CD105, CD166, CD29 and CD44 are positively expressed while CD14, CD34 and CD45 are negative. To clarify the definition of hMSC, in 2006 the ISCT decided to publish criteria for defining hMSC [15]. According to these new criteria, hMSC are positive for CD90, CD105 and CD73 and negative for CD45, CD34, CD11b or CD14, CD19 or CD79 α and HLA-DR. We have defined our cells according to the recommended criteria; however, once we excluded CD11b and CD19 from our pilot experiments, we did not add these markers to our panel, as we were interested in positive rather than negative markers. The fact that we do not have any CD11b⁺

or CD19⁺ cells in our culture can also be demonstrated by the fact that our cells are negative for CD45 and CD10. This means that, in our cultures, we do not have any nucleated blood cells (CD45⁺) or developing B lymphocytes (CD10⁺). Among the markers widely used to define MSC, we found that CD90, CD73 and CD105 were positive and CD235a, CD34 and CD45 were negative in all tested media, independent of the type of serum. CD271 was negative in our cultured cells; however, surface marker expression can be different between cultured and freshly harvested cells, for example CD271 can be used for MSC-enriched isolation from freshly harvested BM [26,27].

The adhesion markers CD29 and CD44, which were strongly expressed only on cells cultivated in human sera, play a crucial role in cell morphology, adhesion and migration. CD29-deficient cells proliferate and survive normally, but show abnormal processes and shape or lose their polarity. CD29^{-/-} mice show severe brain malformations and die prematurely. Schwann cells do not extend and maintain processes around axons [28,29]. This mechanism could explain the morphologic differences among hMSC cultivated in media supplemented with human or bovine sera. In addition, flat cells, which were present in media with bovine serum, are typical of cultures with slow proliferation. Neuhuber *et al.* [24] showed with rat MSC that an increased number of flat cells was dependent on either time in culture or high confluency. CD44-deficient mice are born without any developmental or neurologic deficits, but they show hematologic impairment with an altered distribution of myeloid progenitors; Schmits *et al.* [30] described defective progenitor egress from BM. CD44^{-/-} osteoclasts exhibit an enhanced response to tumor necrosis factor (TNF), as a major inducer of chronic inflammation. Hayer *et al.* [31] concluded that CD44 is a critical inhibitor of TNF-induced joint destruction and inflammatory bone loss. This raises the questions of whether BM and tissue MSC play the same role in inflammation and whether the surface expression of CD44 remains the same after implantation of cultured cells into the host organism.

Somemarkers, such as CD10, CD71, CD51/61 and CD49a, were not expressed in FBS-supplemented serum at all, while low or moderate expression was observed in α -MEM/human sera. CD10 and CD71 are ubiquitous in normal tissues, and their up/down-regulation can correlate with the functional (metabolic) status of cells (not surprisingly in the case of CD71, the transferrin receptor). CD49a and CD61/51 belong among the superfamily of integrins, and their

expression is related to other products of integrin genes (CD29) and other adhesion markers (CD44). CD49d has been shown to play an important role in neural stem cell homing to the stroke area in mice [32].

In a few samples cultured in MSCGM, we observed positivity for HLA-DR+DP. hMSC are generally negative for MHC II antigens; however, these antigens can be expressed after exposure to interferon-gamma or TGF- β 1 [33]. We do not know if some compound was present in MSCGM that could induce the expression of HLA-DR+DP. However, in clinical use, any cell batch that is expanded for patient use should be tested to exclude cells showing MHC II positivity.

Finally, a last criterion for hMSC is their potential to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic phenotypes. Our results demonstrate that the differentiation potential of hMSC cultured in human sera is not affected. Osteogenic differentiation was even faster in hCBS, followed by hABS, confirming the results obtained by Jung *et al.* [34] and Stute *et al.* [25].

Another strategy to overcome the problem of the biosafety of FBS is the use of platelet lysate [35,36] or fresh frozen plasma and platelets [37]. These three studies [35–37] described no change in hMSC characteristics (surface markers, differentiation potential and immune regulatory properties) when serum was replaced by platelet lysate or fresh frozen plasma and platelets, and reported the superior proliferative capacity of the cultured hMSC.

To summarize our findings in terms of potential clinical use, adult ABS is generally available in human medicine in sufficient quantities and ready to use, in contrast to CBS. The use of adult ABS is subjected to the same rules as other human blood derivatives, to avoid possible risks of transmitting viruses such as human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis virus B. The main disadvantage of cord blood serum is its limited source and quantity. MSCGM was designed for hMSC expansion, therefore it yielded good results in all the assessed parameters; however, to date it is only produced for research use, its composition is not disclosed and its use in human medicine depends on company policy. There are some phase I clinical trials that use FBS for the expansion of MSC [38]; however, we have shown that cells grown in FBS not only have a slower expansion rate and never reach confluency, but display a down-regulation of some surface markers compared with cells grown in human sera. We conclude from this study that human allogeneic sera from AB adult donors is the most suitable sera for rapid cell expansion and thus for clinical use.

Acknowledgments

We thank Jarmila Kasparova for technical assistance, James Dutt for critical reading of the manuscript and Marie Hladikova for statistical analysis. This study was supported by the grants AV0Z50390703, 1M0538, LC554, 309/08/H079 and the EC FP6 projects RESCUE (LSHB-CT-2005-518233) and ENINET (LSHM-CT-2005-019063).

Disclosure of interest: The authors declare that they have no competing financial interests.

References

1. Urdziková L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23:1379–91.
2. Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007;15(Suppl 1):S18–26. *Erratum in Wound Repair Regen* 2008;16:582.
3. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009;217:318–24.
4. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 2008;10:223.
5. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 2006;198:54–64.
6. Lanzoni G, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. Inflammatory bowel disease: moving toward a stem cell-based therapy. *World J Gastroenterol* 2008;14:4616–26.
7. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2008;47:1634–43.
8. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:169–83.
9. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinckmann JE. *In vitro* expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005;23:1357–66.
10. Liu L, Xia H, Belák S, Baule C. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J Virol Methods* 2008;154:82–5.
11. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 1997;89:776–9.

12. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152–6.
13. Tusching L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002;13:1605–10.
14. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* 2008;58:501–10.
15. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209–14.
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
17. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67–73.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
19. Brinchman JE. Expanding autologous multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells. *J Neurol Sci* 2008;265:127–30.
20. Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, et al. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Eur Cell Mater* 2008;16:47–55.
21. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;97(Suppl):77–89.
22. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993;8:1453–8.
23. Schutze N, Noth U, Schneidreier J, Hendrich C, Jakob F. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal* 2005;3:5.
24. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 2008;36:1176–85.
25. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 2004;32:1212–25.
26. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:783–91.
27. Bühring HJ, Battula VL, Trembl S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann NY Acad Sci* 2007;1106:262–71.
28. Graus-Porta D, Blaess S, Senften M, Littlewood-Evans A, Damsky C, Huang Z, et al. Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 2001;31:367–79.
29. Feltri ML, Graus-Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* 2002;156:199–209.
30. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, et al. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 1997;90:2217–33.
31. Hayer S, Steiner G, Gortz B, Reiter E, Tohidast-Akrad M, Amling M, et al. CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *J Exp Med* 2005;201:903–14.
32. Guzman R, De Los Angeles A, Cheshier S, Choi R, Hoang S, Liauw J, et al. Intracarotid injection of fluorescence activated cell-sorted CD49d-positive neural stem cells improves targeted cell delivery and behavior after stroke in a mouse stroke model. *Stroke* 2008;39:1300–6.
33. Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 2007;179:1549–58.
34. Jung J, Moon N, Ahn JY, Oh EJ, Kim M, Cho CS, et al. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells Dev* 2009;18:559–71.
35. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Lense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005;205:228–36.
36. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of *in vitro* expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007;211:121–30.
37. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8:437–44.
38. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, et al. Stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2008;265:78–83.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Oxidative damage to biological macromolecules in human bone marrow mesenchymal stromal cells labeled with various types of iron oxide nanoparticles

Bozena Novotna^{a,*}, Pavla Jendelova^{a,b}, Miroslava Kapcalova^a, Pavel Rossner Jr.^a, Karolina Turnovcova^a, Yana Bagryantseva^a, Michal Babic^c, Daniel Horak^c, Eva Sykova^{a,b}

^a Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

^b Charles University, 2nd Faculty of Medicine, 15006 Prague 5, Czech Republic

^c Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 16200 Prague 6, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2011

Received in revised form

21 December 2011

Accepted 9 January 2012

Available online xxx

Keywords:

Iron oxide nanoparticles

Oxidative damage

Human bone marrow mesenchymal stromal cells

ABSTRACT

The biological effects of several superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) varying in their surface coating were tested using human bone marrow mesenchymal stromal cells from two donors – hBMSCs-1 and hBMSCs-2. The measurements were performed at two intervals – after 72 h exposure to the nanoparticles and after an additional 72 h cell growth without nanoparticles. The dose of SPIONs used (15.4 µg Fe/ml) was selected as being sufficient for *in vivo* cell tracking using magnetic resonance imaging (MRI). Concerning cell viability and cell death, only the hBMSCs-2 seemed to be sensitive to the action of SPIONs. However, an increase of oxidative injury to lipids, proteins and DNA as a consequence of exposure to SPIONs was detected in cells from both donors. Particularly the levels of lipid peroxidation were high and increased further with time, regardless of the type of nanoparticle. Lowering intracellular label concentrations and authenticating oxidative stress levels using *in vivo* experiments are required to ensure the safety of SPIONs for biomedical applications.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

To monitor the fate of transplanted cells within the organism, several non-invasive techniques have been introduced, including magnetic resonance imaging (MRI) of cells labeled with a contrast agent prior to grafting (Gupta et al., 2007; Kubinova and Sykova, 2010). At present, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), such as magnetite Fe₃O₄ or its more stable form of maghemite γ-Fe₂O₃, are the most commonly used for magnetic cell labeling because their main component – iron – may be recycled by cells via natural metabolic pathways (Bulte et al., 1999, 2001; Bos et al., 2004; Sykova and Jendelova, 2007). However, uncoated SPIONs have hydrophobic surfaces with large surface to volume ratios and tend to aggregate (Lu et al., 2007). A proper coating of the surface with biocompatible polymers and targeting agents not only improves the stability of SPIONs in suspension, but also increases the specificity, efficiency and speed of their internalization into the target cells (Allen et al., 2004; Zhang and Zhang, 2005; Babic et al., 2008; Shubayev et al., 2009).

Several groups of coating material have already been used to modify SPION surface chemistry, such as organic polymers (e.g. dextran, chitosan, polyethylene glycol) and surfactants (sodium oleate, dodecylamine), inorganic metals (gold) and oxides (silica, carbon), and bioactive molecules and structures (liposomes, peptides and ligands/receptors) (Gupta and Gusta, 2005; Shubayev et al., 2009). Commercially available preparations approved by the FDA for clinical use, such as MRI contrast agents (e.g. Feridex, Endorem or Resovist), usually consist of a magnetite core coated by a biodegradable dextran and carbohydrate derivatives that are characterized by a high affinity to iron oxides. On the other hand, polymer coatings significantly increase the size of the SPIONs, which may affect their penetration ability and metabolic clearance rate in the body. This could explain the reduced intracellular uptake of dextran-coated nanoparticles (Gupta and Gusta, 2005; Wilhelm et al., 2003). Along with the poor functionalization and conjugation capacity of particles with a dextran surface (McCarthy et al., 2007) this stimulated the intensive development of alternative surface modifications to optimize the properties of SPIONs for *in vivo* applications.

Despite initial optimism concerning the safety of SPIONs, today it is evident that the specific properties of nanoparticles, namely an enhanced reactive surface area and the ability to cross cell and tissues barriers, amplify their cytotoxic potential in comparison with bulk materials of the same composition (Nel et al., 2006; Shubayev et al., 2009). *In vivo* experiments have demonstrated

* Corresponding author at: Department of Genetic Ecotoxicology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic. Tel.: +420 241 062 209; fax: +420 241 062 785.

E-mail address: novotna@biomed.cas.cz (B. Novotna).

that the toxicity of a nanomaterial may depend upon its composition, size, surface functionalisation and route of exposure (Harper et al., 2008). The elicitation of reactive oxygen species (ROS) generation and cellular oxidative stress, subsequently resulting in oxidative damage to biological macromolecules, cellular dysfunction and cell death, are generally considered to be the underlying mechanisms involved in nanomaterial toxicity (Nel et al., 2006; Shubayev et al., 2009; Karlsson et al., 2009; Donaldson et al., 2010). An effort to improve the biological properties of nanoparticles, such as their cellular internalization, could thus also result in an increase of undesirable effects (Oberdörster et al., 2005; El-Ansary and Al-Daihan, 2009). This has evoked debate on the urgent need to develop reliable toxicity test systems capable of identifying the potential risks of nanoparticles prior to their application in biomedicine (Dusinska et al., 2009; Kroll et al., 2009; Landsiedel et al., 2009, 2010; Soenen et al., 2011).

Our laboratory has engaged for a long time in research aimed at developing therapeutic procedures to facilitate the recovery of the central nervous system from traumatic injury, ischemia, or degenerative diseases using the transplantation of bone marrow stromal cells (Jendelova et al., 2003; Sykova and Jendelova, 2006; Hejcl et al., 2008, 2010). In order to improve the efficiency of cell labeling, we have focused, among other topics, on the design of new SPIONs and investigations of their surface and morphological characteristics. Up to now, several types of SPIONs with promising properties have been developed, such as, for example, those coated with D-mannose (Horak et al., 2007), poly-L-lysine (Babic et al., 2008) or poly-(N,N-dimethylacrylamide) (Babic et al., 2009). Compared to the commercially available contrast agent Endorem, these newly developed particles exhibit higher relaxivities, which are responsible for contrast in MRI, and easier internalization by cells (Horak et al., 2009).

The current report summarizes the results of a study analyzing the biological effects of different SPIONs (*i.e.*, varying in their surface coating) on human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBMSCs). Due to their multilineage differentiation potential and capability to produce growth factors and cytokines facilitating tissue regeneration and repair (Pittenger et al., 1999), these cells represent a promising tool for regenerative medicine. For testing, SPIONs developed by our team, *i.e.*, SPIONs coated with D-mannose, poly-L-lysine or poly-(N,N-dimethylacrylamide), were selected and the results were compared with the effects of uncoated γ -Fe₂O₃ and commercially produced Endorem®. Intracellular magnetic labeling with SPIONs is often facilitated by the simultaneous addition of the transfection agent poly-L-lysine (PLL) into the culture medium (Frank et al., 2003; Suzuki et al., 2007). Likewise, the use of PLL as a coating material may considerably improve the labeling efficiency of nanoparticles (Babic et al., 2008). Therefore, we also analyzed the effects of a mixture of Endorem® with PLL and Endorem® coated with PLL.

The genotoxicity of the particles was studied using an alkaline version of single cell gel electrophoresis (comet assay) with an analog of mammalian OGG1–formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDO III) (Collins, 2004). This approach enables the detection of single- and double-strand breaks in DNA (DNA-SB), transient gaps arising as intermediates during base excision repair, alkali-labile sites, apoptotic DNA fragmentation and a broad spectrum of oxidized purines and pyrimidines (Singh et al., 1988; Darzynkiewicz and Traganos, 1998; Tice et al., 2000; Møller et al., 2000; Møller, 2005). Recently, the method has been successfully applied for the testing of nanomaterial genotoxicity (Landsiedel et al., 2009; Karlsson, 2010).

Further, the concentrations of 15-F_{2t}-isoprostane (15-F_{2t}-IsoP) and protein carbonyl groups were assessed as markers of lipid and protein oxidation, respectively (Cracowski et al., 2002; Stadtman, 2001; Chevion et al., 2000), and the study was completed by the

determination of cell viability, cell death and the efficiency of cell labeling.

2. Materials and methods

2.1. Iron oxide nanoparticles

The nanoparticles used for hBMSC labeling included the commercially available contrast agent Endorem® based on Fe₃O₄ coated with dextran (Guerbet, Roissy, France). Other types of maghemite particles (γ -Fe₂O₃) were prepared in the Institute of Macromolecular Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic according to patent No. 301067 by coating γ -Fe₂O₃ with poly-L-lysine (PLL- γ -Fe₂O₃), D-mannose (mannose- γ -Fe₂O₃) or poly(NN-dimethylacrylamide) (PDMAAm- γ -Fe₂O₃). The transfection agent poly-L-lysine hydrobromide (PLL; Sigma, Saint Luis, Missouri, USA) was also used as a coating material for Endorem® particles (PLL-Endorem®); alternatively, this agent was added to the culture medium in a mixture with Endorem® particles (Endorem® + PLL) at a final concentration of 25 µg/ml of ferumoxide and a final dilution of the transfection agent of 1:2000 (Arbab et al., 2003b). The latter combination was tested only in hBMSCs-2. Uncoated γ -Fe₂O₃ served as a positive control. All investigated nanoparticles were thoroughly characterized in our earlier reports (Horak et al., 2007, 2009; Babic et al., 2008, 2009). Their main properties are summarized in Table 1.

2.2. Cell cultures and labeling with nanoparticles

Human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBMSCs) were obtained from the bone marrow of 2 anonymous healthy donors: hBMSCs-1 (age – 12 years) and hBMSCs-2 (age – 54 years). Informed consent was obtained from donor 2 and parents of donor 1, and the study followed the guidelines of the institutional ethical committee. Bone marrow aspirates were diluted in a Gelofusine density gradient (Gelofusine®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Marrow cells were plated in a 75-cm² tissue culture flask (TPP, Trasadingen, Switzerland) in Alpha-Modified Eagle Medium (α -MEM, Gibco BRL, Paisley, Scotland) containing 10% fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria) and 2 µl/ml primocin (Amixa, Gaithersburg, MD, USA). After 24-h cultivation in a humidified 5% CO₂ incubator, the nonadherent cells were removed by replacing the medium, then the medium was replaced every 3 days as the cells grew to confluence. The multipotent differentiation capacity and surface marker profile of the isolated hBMSCs were analyzed according to the guidelines set by the *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006) as reported previously by our group (Turnovcova et al., 2009).

Cell labeling was performed by 72 h incubation of hBMSCs from the 3rd passage in a nanoparticle suspension containing 15.4 µg of iron/ml of culture medium. This dose is sufficient for *in vivo* cell tracking using MRI and results in intracellular concentrations of iron ranging between 14.6–51.7 pg (Babic et al., 2008, 2009; Horak et al., 2009), which are comparable with the generally used protocol based upon the mixture of ferumoxides with PLL (Frank et al., 2003). Then, the nanoparticles were washed out and incubation continued for the next 72 h in fresh medium. A parallel culture of untreated cells was used as a negative control.

2.3. Labeling efficiency

The iron-labeled hBMSCs were fixed with 4% paraformaldehyde (in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) for 20 min, washed, and stained for iron to produce ferric ferrocyanide (Prussian blue). Nuclei were counterstained with hematoxylin eosin or nuclear fast red.

The labeling efficiency was determined by counting the number of Prussian blue-stained and unstained nanoparticle-labeled cells in 24-well plates. Five optic fields from each well were scanned using an AxioObserver D.1 inverted microscope, AxioCam digital camera and AxioVision 4 software (microscope setup from Zeiss, Oberkochen, Germany). All of the cells in the scanned images were manually labeled using Jasc Paint Shop Pro 8 (Corel Corporation, Ottawa, Canada). The scanned images with manually labeled cells were processed by the Image analysis toolbox of MATLAB software (The MathWorks, Inc., Massachusetts, USA); the presence of cytoplasmic staining was evaluated for each cell, and the percentage of Prussian blue-stained cells was calculated.

Nanoparticle localization inside the cells was verified by transmission electron microscopy (TEM). The hBMSCs-2 were incubated with the nanoparticles for 72 h, transferred onto PLL-coated coverslips, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Sörensen's buffer for 48 h at 4 °C, and stained by 1% osmium tetroxide in 0.1 M Sörensen's buffer for 2 h. Then, they were dehydrated in ethanol, immersed in propylene oxide and flat embedded in Epon 812 using gelatin capsules. After polymerization for 72 h at 60 °C, the coverslips were removed by liquid nitrogen. Ultrathin sections of 60 nm were examined with a Philips Morgagni 268D transmission electron microscope (FEI Inc., Hillsboro, OR, USA).

2.4. Cell viability

Cell viability was assessed using the WST-1 colorimetric assay based on the cleavage of the tetrazolium salt 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to a

Table 1

The properties of different types of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

Type of SPIONs	<i>D_n</i> (nm)	PDI	<i>D_h</i> (nm)	Zeta potential (mV)	<i>N</i> /colloid	<i>N</i> /media	<i>N</i> /cm ²
Endorem®	5.5	1.43	130	−30	3.73E+16	5.10E+13	4.97E+12
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	5.5	1.3	108	−37	1.04E+16	5.19E+13	6.92E+12
PLL-Endorem®	5.6	1.45	124	−29	9.83E+15	4.92E+13	6.55E+12
PDMAAm- γ -Fe ₂ O ₃	7.5	1.2	57	−43	4.09E+15	2.05E+13	2.73E+12
Mannose- γ -Fe ₂ O ₃	7	1.33	73	−44	5.03E+15	2.52E+13	3.35E+12
γ -Fe ₂ O ₃	6	1.46	63	−47	7.99E+15	3.99E+13	5.33E+12

D_n – number-average particle diameter according to TEM analysis; PDI – polydispersity index (ratio of weight- to number-average particle diameter); *D_h* – hydrodynamic diameter from dynamic light scattering; *N*/colloid – number of nanoparticles per ml of colloid; *N*/media – number of nanoparticles per ml of culture media; *N*/cm² – number of nanoparticles per cm² of culture dish.

highly water-soluble formazan dye by mitochondrial dehydrogenases in viable cells. Cells from the 3rd passage plated on 96-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) at a density of 2×10^3 cells/well were cultured with SPIONs as described above. On day 3, when the nanoparticles were washed out (interval 1), and after an additional 72 h cell growth in fresh medium without SPIONs (interval 2), 10 μ l of the WST-1 solution was added to 100 μ l of culture medium per well, and the cells were kept in an incubator (37 °C) for an additional 2 h. The absorbance was measured using an ELISA plate reader (Tecan Spectra, Tecan Trading, Switzerland) at a wavelength of 450 nm. Parallel culture without SPIONs served as a control. Medium containing the corresponding nanoparticles was used as a blank for labeled cells, while ordinary culture medium was used as a blank for unlabeled cells. The final values were obtained as the difference between the cellular readings and the blank values.

2.5. Cell death

Annexin V/Propidium Iodide (PI) labeling was performed according to the manufacturer's protocol in harvested cells, without any fixation. The proportion of intact live cells (Annexin V[−]/PI[−]), cells entering apoptosis (Annexin V⁺/PI[−]) and late apoptotic and/or necrotic cells (Annexin V⁺/PI⁺) were analyzed in 7000–10,000 cells/sample using FACS Diva Software.

2.6. DNA damage

DNA damage in hBMSCs was analyzed using an alkaline version of the comet assay (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Cells harvested at intervals 1 and 2 were diluted with fresh medium to a concentration $0.6\text{--}1 \times 10^3$ cells/ml, and four slides were prepared per sample (for details see Novotna et al., 2007). Then, the slides were submerged for 1 h in a lysing solution (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.16 M DMSO, 0.016 mM Triton X-100, all Sigma–Aldrich, Germany) at pH 10. After washing with PBS, two slides per sample were treated with 45 μ l of FPG and ENDO III in a 1:1 mixture (final concentration of both enzymes 2.5 μ l/ml; Sigma–Aldrich, Germany) for 1 h at 37 °C. In parallel, two slides were treated with the same volume of buffer used for the dilution of enzymes (0.1 M KCl, 4 mM EDTA, 2.5 mM HEPES, 2% BSA, all Sigma–Aldrich, Germany). Subsequently, the slides were equilibrated for 40 min in alkaline buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was performed in fresh alkaline buffer (20 min, 1.2 V/cm, 300 mA). Finally, the slides were neutralized in 0.4 M Tris (pH 7.5), stained with 0.005% ethidium bromide (Sigma–Aldrich, Germany) for 7 min, washed with distilled water (7 min), fixed in methanol (15 min), dried at room temperature and stored. To avoid artificial damage to the DNA, all manipulations with the cells until the treatment in lysing solution were performed under a yellow light.

Before analysis, the slides were rehydrated in distilled water, and images were captured with a CCD camera (VDS, Vosskuhler, Germany) attached to a VANOX BHS fluorescence microscope (Olympus, Japan). The extent of DNA migration was quantified using Lucia G 4.81 software (Laboratory Imaging, Czech Republic), and the results were expressed as the percentage of DNA in the tail (Tail DNA %). Both total DNA damage (with enzymes) and DNA strand breaks (DNA-SB; without enzymes) were measured in 2×50 randomly selected cells per slide, and medians were calculated from every group of 50 cells. The level of oxidative DNA damage was assessed as the difference between the median of total DNA damage and the median of DNA-SB. For both types of DNA damage, we thus obtained 4 values per sample that were used for statistical analysis of the differences between the samples.

2.7. Lipid peroxidation and protein oxidation

Cells harvested at intervals 1 and 2 were centrifuged at 1500 rpm and the cell pellet stored at −80 °C. To prepare cell lysates, the cells were thawed and mixed with 100 μ l of CellLytic reagent (Sigma–Aldrich, Germany), incubated for 15 min at room temperature on a shaker and vortexed thoroughly every 5 min. Then the samples were centrifuged for 15 min at $18,000 \times g$ at 4 °C. The supernatant was transferred to a new tube and either stored at −80 °C or used directly for the analysis of total protein concentration using a Bicinchoninic Acid Kit (Sigma–Aldrich, Germany).

The concentration of 15-F_{2t}-IsoP in the cell lysates was analyzed using immunoassay kits from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). First, membrane-bound 15-F_{2t}-IsoP was hydrolyzed and the samples were purified. Cell lysates containing 50 μ g of protein were diluted with dH₂O to 100 μ l. Then, 100 μ l of 15% KOH was added, the samples were vortexed and incubated 60 min at 40 °C. The pH of the samples was adjusted by adding 300 μ l of 1 M KH₂PO₄; 100 μ l of column buffer (containing 13.6 g KH₂PO₄, 29.2 g NaCl, 0.5 g Na₂S per 1000 ml, pH 7.4) was added, and the samples were mixed. The next step included adding 50 μ l of Iso-prostane Affinity Sorbent (Cayman Chemical Company) and incubating for 60 min at room temperature on a shaker. After the incubation, the samples were centrifuged 1 min at $5000 \times g$ and the supernatant was decanted. The 15-F_{2t}-isoprostane bound to the sorbent was washed with 1 ml of dH₂O and eluted from the sorbent by its resuspension in 0.5 ml of Elution solution (95% ethanol). The samples were then stored in Elution solution at −80 °C until analysis. Before the assay, the samples were vacuum-dried, resuspended in 110 μ l of EIA buffer (supplied with the 15-F_{2t}-IsoP kit) and immediately used for ELISA, which was performed according to the instructions provided by the manufacturer.

Protein oxidation was analyzed using a protocol previously modified in our laboratory (Rossner et al., 2007) with other changes that included a decrease in the total protein content in the sample needed for the derivatization step. Briefly, the analyzed cell lysates were diluted with PBS to a final protein concentration of 2 mg/ml. Ten μ l of the samples were mixed with 10 μ l of DNPH solution (derivatization solution), the samples were incubated at room temperature in the dark for 45 min and vortexed every 10–15 min. The derivatization process was stopped by adding 30 μ l of 2 M Tris, then the samples were mixed on a shaker and briefly centrifuged. 6.25 μ l of the derivatized samples were added to 1.25 ml of the coating buffer, mixed and used for coating the ELISA plates. The ELISA assay was performed as described previously (Rossner et al., 2007).

2.8. Statistical analysis

An unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to analyze the significance of differences between the two groups for all analyzed parameters, with the exception of dead cell proportions. In this case, the Chi-square test was applied. A *p*-value of less than 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. Labeling efficiency

TEM images confirmed that all the nanoparticles were taken up by the cells (Fig. 1). They were found in the form of clusters in endosomes or lysosomes spread throughout the cell cytoplasm. However, the two cell cultures established from different donors did not show an identical uptake of the different types of SPIONs (Fig. 2). In comparison with hBMSCs-1, hBMSCs-2 were more efficiently labeled with Endorem® and mannose- γ -Fe₂O₃ particles and less efficiently with PLL-Endorem® particles.

Among the analyzed types of particles, those commercially produced appeared to be the least efficient. This was more apparent in hBMSCs-1 (Fig. 2), where a significantly lower percentage of cells was labeled with Endorem® particles than with any of the other analyzed types, including uncoated SPIONs (γ -Fe₂O₃). Although hBMSCs-2 showed a similar trend, the difference between Endorem® and γ -Fe₂O₃, as well as between Endorem® and PDMAAm- γ -Fe₂O₃, was not statistically significant (Fig. 2). The combination of the transfection agent poly-L-lysine with Endorem®

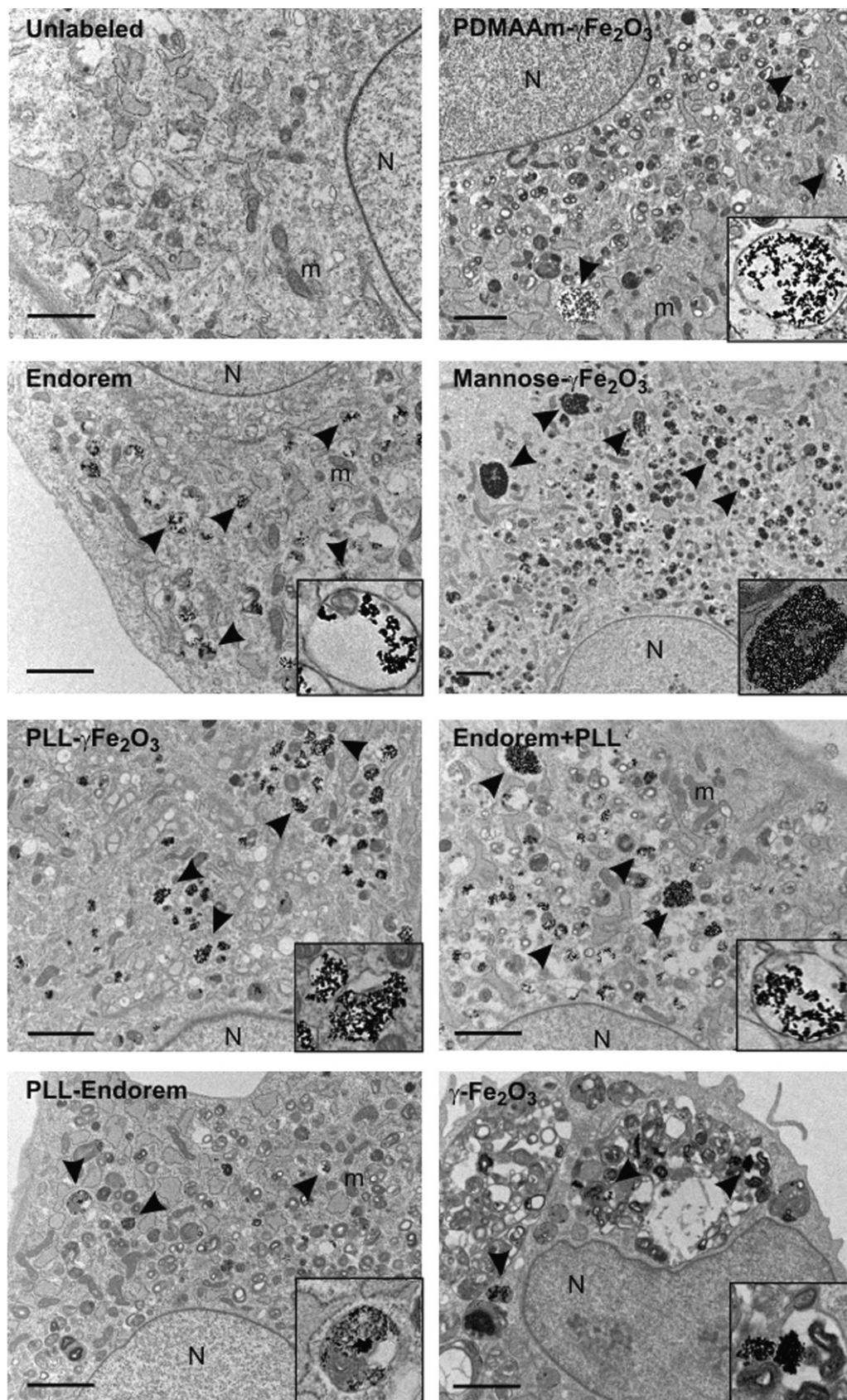


Fig. 1. TEM micrographs of unlabeled and labeled hBMSCs-2 with different SPIO nanoparticles. Arrowheads indicate clusters of nanoparticles inside the endosomes/lysosomes and/or in the cytoplasm. Insets show higher magnification views of nanoparticle clusters surrounded by membranes inside the cell. N-nucleus, m-mitochondrion, Scalebar 2 μ m.

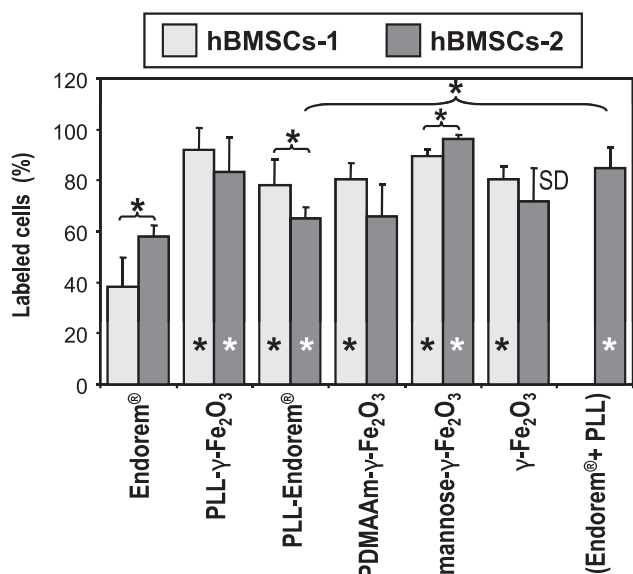


Fig. 2. Efficiency of hBMSC labeling with different types of SPIONs assessed after 72 h cell growth with nanoparticles. SD – standard deviation; * $p < 0.05$ (asterisks in the columns indicate significant differences in comparison with commercial Endorem® particles – black asterisks for hBMSCs-1, white for hBMSCs-2); PLL-γ-Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm-γ-Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose-γ-Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ-Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

improved the labeling efficiency of Endorem® alone and was more effective than the use of poly-L-lysine as a coating material for Endorem® particles (Fig. 2).

3.2. Cell viability

The effects of different types of SPIONs on the viability of hBMSCs assessed by the WST-1 colorimetric assay are summarized in Table 2 and Fig. 3A. In comparison with the control (unexposed) cells, 72 h cultivation of hBMSCs-1 with SPIONs resulted in a reduction of cell viability only in cultures labeled with PLL-γ-Fe₂O₃ and mannose-γ-Fe₂O₃ particles (83% and 90% of the control level), i.e., in cultures with the highest percentage of labeled cells. This effect was fully reversible and disappeared after the additional 72 h cell growth in SPION-free medium (interval 2).

On the other hand, hBMSCs-2 seemed to be sensitive to any of the tested SPIONs, particularly to uncoated γ-Fe₂O₃ and PLL-γ-Fe₂O₃ particles. Although the labeling efficiency of these particles was comparable in both cell cultures (Fig. 2), 72 h cultivation of hBMSCs-2 with them resulted in approximately a 50% reduction of cell viability when compared to the control culture. Other types of SPIONs, namely Endorem®, mannose-γ-Fe₂O₃, and the (Endorem® + PLL) combination, also induced a significant decrease of hBMSC-2 viability (68–70%) that persisted even after an additional 72 h cell growth in medium without SPIONs. At that time, a reduction of cell viability was apparent in all labeled cells regardless of the type of nanoparticles. The most pronounced effect was noted again in hBMSCs-2 labeled with γ-Fe₂O₃ and PLL-γ-Fe₂O₃ particles, showing only 36% and 41% of the control values, respectively.

3.3. Cell death

The hBMSCs-1 showed at both analyzed intervals only negligible levels of cell death, regardless of the type of SPIONs (Table 3; Fig. 3B). At interval 1, none of the analyzed SPIONs significantly increased the number of dead cells above the control level. The

same result was observed at interval 2. After the correction of data for 100% labeling efficiency, the PDMAAm-γ-Fe₂O₃-labeled cells showed a statistically significant effect that, however, represented only 4% of dead cells.

The hBMSCs-2 were more sensitive to the toxic effect of SPIONs than the hBMSCs-1 (Table 3; Fig. 3B). At interval 1, the percentage of dead cells ranged between 7% and 17% for Endorem® and uncoated particles, respectively. The Endorem® particles thus seemed to be the SPIONs with the lowest toxicity. However, the correction of the results for 100% labeling efficiency indicated that there was no difference in cytotoxic potential among the tested SPIONs (Fig. 3B). For uncoated particles, the correction suggested that 100% labeling efficiency could increase their toxic effect up to 23% of dead cells, i.e., 5 times the percentage seen in the control culture (4.5%).

At interval 2, the control values of dead cells were reached only in PLL-Endorem®-labeled cells (Fig. 3B). All other SPIONs still induced high levels of cell death. Among them, PLL-γ-Fe₂O₃ and mannose-γ-Fe₂O₃ particles exhibited the greatest toxicity (17% and 18% of dead cells, respectively). The correction for 100% labeled cells, however, identified the Endorem® and PDMAAm-γ-Fe₂O₃ particles as those with the highest toxic potential (24% and 23% of dead cells, respectively).

3.4. DNA damage

The results of the comet assay documented the genotoxic activity of the analyzed SPIONs (Table 4, Fig. 4). In the experiment with h-BMSCs-1, Endorem® particles appeared to be safe as they did not significantly influence the level of DNA damage at either harvesting interval. Assuming 100% labeling efficiency, however, these particles would be among the most genotoxic SPIONs (Fig. 4). All other particles increased the level of DNA damage above the control value. In general, this effect was more pronounced at interval 2, except in mannose-γ-Fe₂O₃-labeled cells that exhibited a mild decrease of DNA damage (11.6% Tail DNA) in comparison with the preceding interval (15.7% Tail DNA). Nevertheless, this level still significantly exceeded (by 2.7-fold) the control values.

In the experiment with hBMSCs-2, only PDMAAm-γ-Fe₂O₃ and γ-Fe₂O₃ particles significantly increased the relative levels of DNA damage at interval 1 (Fig. 4). However, a strong genotoxic effect of the SPIONs was manifested at interval 2. The only exception was the combination of Endorem® particles with PLL, which induced DNA damage comparable to the control level (Fig. 4). On the other hand, PDMAAm-γ-Fe₂O₃ and Endorem® particles appeared to be the most genotoxic, particularly after correcting for 100% labeling efficiency.

3.5. Oxidative damage to proteins

Oxidative damage to proteins significantly exceeding the control levels was detected in both hBMSCs-1 and hBMSCs-2, irrespective of the SPION type (Fig. 4). While the effect of the different types of particles was relatively equal in hBMSCs-1, hBMSCs-2 seemed to be susceptible primarily to the action of mannose-γ-Fe₂O₃ particles. When compared to the control, the cells labeled with these particles exhibited an almost five-fold increase in the number of carbonyl groups at interval 2.

3.6. Lipid peroxidation

Concerning oxidative damage to lipids, both cell cultures were very sensitive to the action of SPIONs, although a significant effect of Endorem® and PDMAAm-γ-Fe₂O₃ particles was not detected until interval 2 (Fig. 4). In general, the effect of the SPIONs intensified at this interval when compared to the preceding one. In hBMSCs-1,

Table 2

The effect of different types of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) on the viability of hBMSCs assessed by the WST-1 colorimetric assay. Interval 1 – 72 h cell growth with nanoparticles in the culture medium; interval 2 – additional 72 h cell growth without nanoparticles in the culture medium. PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

Type of SPIONs	Absorbance at 450 nm							
	hBMSCs-1				hBMSCs-2			
	Interval 1		Interval 2		Interval 1		Interval 2	
	Mean \pm SE	N	Mean \pm SE	N	Mean \pm SE	N	Mean \pm SE	N
None	0.52 \pm 0.01	8	0.67 \pm 0.01	8	0.55 \pm 0.02	8	0.74 \pm 0.02	6
Endorem®	0.58 \pm 0.04	6	0.74 \pm 0.01*	8	0.35 \pm 0.01*	8	0.38 \pm 0.01*	8
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	0.43 \pm 0.02*	8	0.75 \pm 0.02*	8	0.28 \pm 0.02*	7	0.30 \pm 0.01*	7
PLL-Endorem®	0.50 \pm 0.03	7	0.74 \pm 0.02*	8	0.53 \pm 0.02	7	0.57 \pm 0.01*	8
PDMAAm- γ -Fe ₂ O ₃	0.53 \pm 0.02	6	0.67 \pm 0.02	7	0.51 \pm 0.03	6	0.56 \pm 0.01*	7
Mannose- γ -Fe ₂ O ₃	0.46 \pm 0.02*	8	0.66 \pm 0.03	7	0.45 \pm 0.01*	8	0.61 \pm 0.02*	8
(Endorem® + PLL)	nd	–	nd	–	0.41 \pm 0.01*	5	0.49 \pm 0.01*	8
γ -Fe ₂ O ₃	0.51 \pm 0.02	7	0.91 \pm 0.01*	8	0.28 \pm 0.03*	6	0.27 \pm 0.01*	8

SE – standard error; N – number of measurements; nd – not done.

* $p < 0.05$ (comparison with the control sample).

PDMAAm- γ -Fe₂O₃- and mannose- γ -Fe₂O₃-labeled cells exhibited the highest levels of lipid peroxidation, i.e., an 11- and 10-fold increase when compared to the control values, respectively. In hBMSCs-2, PLL- γ -Fe₂O₃ and mannose- γ -Fe₂O₃ particles induced the highest levels of oxidative damage to lipids, 13- and 15-fold higher than those seen in the control cells, respectively.

4. Discussion

In agreement with our previous results (Horak et al., 2009), the commercial contrast agent Endorem® showed the lowest labeling potential (about 40–60% of labeled cells) in comparison with the other types of tested nanoparticles, while PLL- γ -Fe₂O₃ and

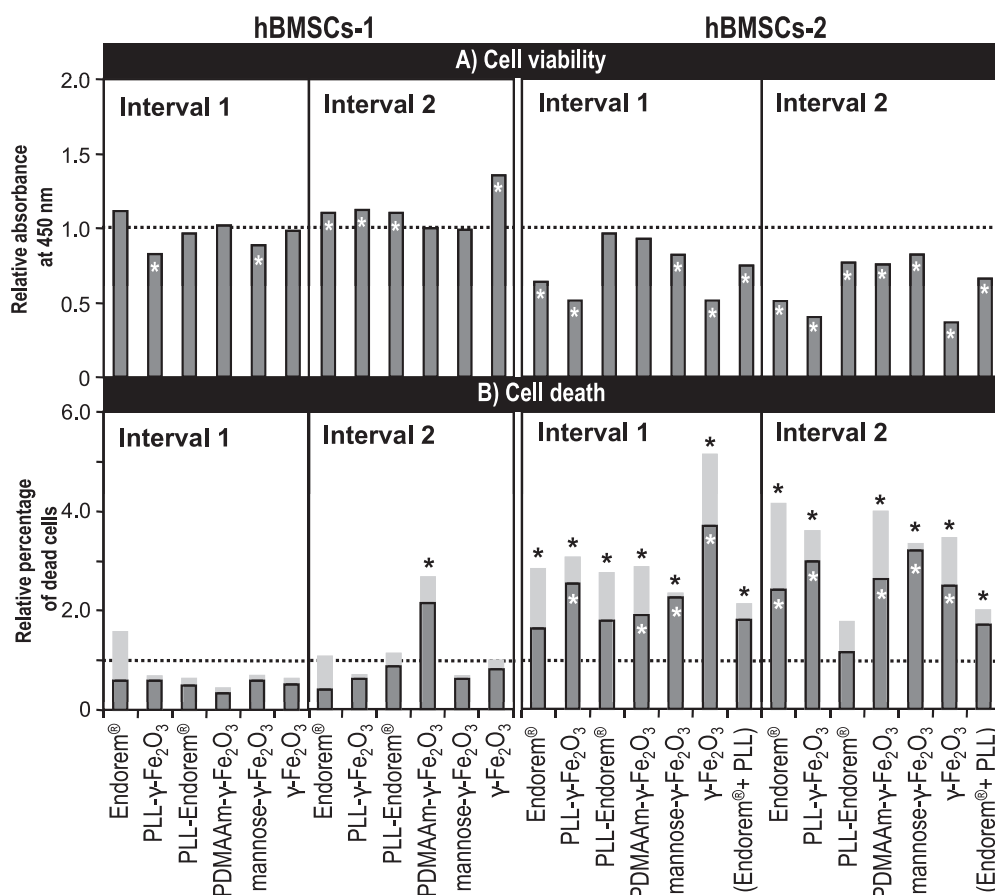


Fig. 3. The effect of different types of SPIONs on cell viability (A) and cell death (B) after 72 h growth of hBMSCs with nanoparticles in the culture medium (interval 1) followed by 72 h growth of hBMSCs without nanoparticles in the culture medium (interval 2). The data are related to the control values, so that the dotted line indicates the control level = 1. The light gray extensions of the dark columns indicate the hypothetical level of cell death after correcting the data for 100% labeling efficiency; the white asterisks indicate a significant difference between the given sample and the control ($p < 0.05$), while black asterisks indicate the same after correcting the data for 100% labeling efficiency; PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

Table 3

Toxicity of different types of SPIONs in hBMSCs: FACS analysis of cells labeled with Annexin V/propidium iodide. Interval 1 – 72 h cell growth with nanoparticles in the culture medium; interval 2 – additional 72 h cell growth without nanoparticles in the culture medium. PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

Type of SPIONs	Number of dead cells (%)							
	hBMSCs-1				hBMSCs-2			
	Interval 1		Interval 2		Interval 1		Interval 2	
	Early apoptosis	Late apoptosis + necrosis	Early apoptosis	Late apoptosis + necrosis	Early apoptosis	Late apoptosis + necrosis	Early apoptosis	Late apoptosis + necrosis
None	2.0	3.7	0.3	1.2	1.6	2.9	1.6	4.1
Endorem®	0.7	2.7	0.3	0.3	1.8	5.6	3.4	10.3
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	2.3	1.1	0.3	0.6	3.9	7.5	3.9	13.1
PLL-Endorem®	0.5	2.3	0.3	1.0	2.2	5.8	0.8	5.7
PDMAAm- γ -Fe ₂ O ₃	1.0	0.9	0.6	2.6	3.2	5.3	3.8	11.2
Mannose- γ -Fe ₂ O ₃	1.9	1.5	0.3	0.6	5.2	4.9	6.6	11.6
(Endorem® + PLL)	nd	nd	nd	nd	2.1	6.0	1.7	8.0
γ -Fe ₂ O ₃	1.9	1.0	0.6	0.6	5.8	10.8	3.0	11.2

mannose- γ -Fe₂O₃ particles internalized most efficiently (between 80% and 100% of labeled cells). Nanoparticle uptake into cells is primarily determined by their size and surface chemistry. Mannose- γ -Fe₂O₃ particles are internalized by the mechanism of mannose transport, which is peculiar to the majority of mammalian cells. PLL- γ -Fe₂O₃ particles enter the cells via the different charges of PLL and the cell surface. Analogous to Endorem®, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ particles are taken up by endocytosis. The greater cellular uptake of PDMAAm- γ -Fe₂O₃ than Endorem® particles may be associated with (1) their positive surface charge interacting with the negatively charged cell membrane and (2) their smaller diameter compared to that of Endorem® (Horak et al., 2009). Size also probably played a role in the relatively low labeling efficiency of PLL-coated Endorem® particles in comparison with the complex of uncoated Endorem® and transfection agent. The diameter of Endorem® itself is about 130 nm, and PLL coating almost doubled its size (145–260 nm).

However, not only the different types of SPIONs showed varying labeling efficiencies. The cellular uptake of even the same type of particle differed markedly between human bone marrow stromal cells originating from various donors. For example, the labeling efficiency in hBMSCs-1 was 92% for PLL- γ -Fe₂O₃ particles, 80% for PDMAAm- γ -Fe₂O₃ particles and 38% for Endorem®, while in hBMSCs-2 these values were 83%, 66% and 58%, respectively. It is well known that SPION uptake can vary greatly among

different cell types (Arbab et al., 2003a; Soenen et al., 2010). Some differences have also been observed between human and rat mesenchymal stem cells from different passages (Horak et al., 2009). In the present study, however, we used exclusively cells from the 3rd passage. The results thus suggest that the genotype of a particular donor could also influence the efficiency of nanoparticle transport into hBMSCs.

Likewise, the response of cells to the action of SPIONs seems to be donor-dependent. For example, Montzka et al. (2010) observed different responses of hBMSCs from different donors to stimulation by lipopolysaccharide (LPS) and tissue homogenates (representing tissue debris) from normal and pathologic tissues. We obtained similar results. The hBMSCs-1 showed a significant but transient decrease of cell viability only when cultured with the most efficient labels (PLL- γ -Fe₂O₃ and mannose- γ -Fe₂O₃ nanoparticles). Accordingly, no increase of cell death over the control values was observed in any of the treated hBMSC-1 cultures. Until recently, the absence of acute toxic effects had been a sufficient condition to consider nanoparticles as biocompatible. Using these criteria, the results in hBMSC-1 culture would suggest that, in principle, none of the tested SPIONs represents a serious risk of damage to bone marrow stromal cells. However, the analysis of hBMSCs-2 showed a somewhat different picture. With the exception of PLL-Endorem® and PDMAAm- γ -Fe₂O₃ particles, all SPIONs significantly affected cell viability, and this effect was even more pronounced after the

Table 4

DNA damage induced in hBMSCs by different types of SPIONs: the results of the comet assay with enzymes of excision repair (ENDO III and FPG). Interval 1 – 72 h cell growth with nanoparticles in the culture medium; interval 2 – additional 72 h cell growth without nanoparticles in the culture medium. PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

Type of SPIONs	DNA damage: Tail DNA (%)							
	hBMSCs-1				hBMSCs-2			
	Interval 1		Interval 2		Interval 1		Interval 2	
	DNA-SB	Oxidized nucleobases	DNA-SB	Oxidized nucleobases	DNA-SB	Oxidized nucleobases	DNA-SB	Oxidized nucleobases
	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE
None	3.19 \pm 0.67	0.88 \pm 0.45	2.13 \pm 0.29	2.23 \pm 0.37	7.35 \pm 0.84	7.25 \pm 1.99	3.79 \pm 0.55	2.67 \pm 1.91
Endorem®	4.70 \pm 0.64	1.85 \pm 1.88	2.96 \pm 0.77	4.81 \pm 2.72	10.34 \pm 1.40	5.68 \pm 3.91	5.33 \pm 0.55	9.22 \pm 1.49*
PLL- γ -Fe ₂ O ₃	8.83 \pm 0.73*	2.35 \pm 1.77	11.96 \pm 2.51*	3.43 \pm 3.06	10.39 \pm 0.90*	5.29 \pm 2.76	11.23 \pm 1.04*	3.85 \pm 2.51
PLL-Endorem®	4.76 \pm 0.40	1.89 \pm 1.58	2.77 \pm 0.58	6.39 \pm 1.60*	8.52 \pm 1.13	2.26 \pm 1.72	6.07 \pm 1.16	5.91 \pm 1.70
PDMAAm- γ -Fe ₂ O ₃	6.25 \pm 0.97*	2.66 \pm 2.15	3.47 \pm 0.69	10.32 \pm 1.93*	17.45 \pm 1.87*	6.28 \pm 2.79	15.38 \pm 1.72*	7.41 \pm 2.89
Mannose- γ -Fe ₂ O ₃	5.63 \pm 1.09	10.03 \pm 2.41*	6.20 \pm 0.64*	5.44 \pm 1.81	21.33 \pm 2.45*	0.54 \pm 2.17	8.49 \pm 1.27*	5.71 \pm 1.12
(Endorem® + PLL)	nd	nd	nd	nd	9.57 \pm 1.52	6.05 \pm 2.78	5.13 \pm 0.65	4.13 \pm 2.29
γ -Fe ₂ O ₃	6.46 \pm 1.48	0.76 \pm 1.07	5.38 \pm 1.72	9.77 \pm 2.38*	16.09 \pm 2.53*	7.94 \pm 5.54	6.69 \pm 0.51*	6.18 \pm 1.79

SE – standard error; nd – not done

* $p < 0.05$

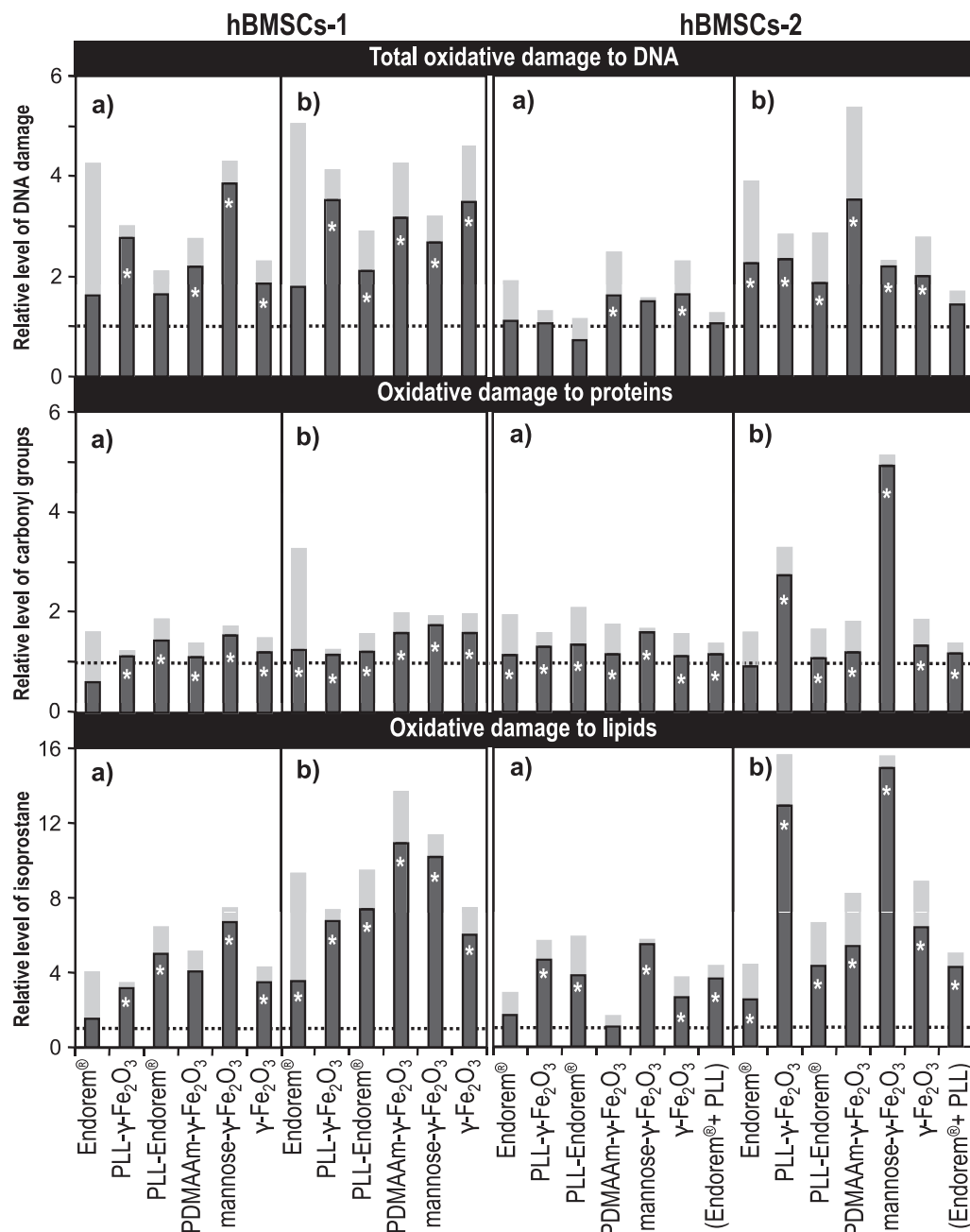


Fig. 4. Oxidative damage to biological macromolecules in hBMSCs labeled with different types of SPIONs: assessment after (a) 72 h cell growth with nanoparticles in the culture medium followed by (b) an additional 72 h cell growth without nanoparticles in the culture medium. The data are related to the control values, so that the dotted line indicates the control level=1. The light gray extensions of the dark columns indicate the hypothetical level of damage after correcting the data for 100% labeling efficiency. * $p < 0.05$; PLL- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly-L-lysine (PLL), PLL-Endorem® = Endorem® coated with PLL, PDMAAm- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with poly(*N,N*-dimethylacrylamide), mannose- γ -Fe₂O₃ = maghemite coated with D-mannose, (Endorem® + PLL) = mixture of Endorem® and PLL, γ -Fe₂O₃ = uncoated maghemite.

additional cultivation of the cells in nanoparticle-free medium. At that time, all tested SPIONs induced a marked decline of cell viability, ranging between 36% and 82% for uncoated maghemite and mannose- γ -Fe₂O₃ particles, respectively.

Concerning cell death, its levels were also higher in hBMSCs-2 compared to those seen in hBMSCs-1, and recalculating the results for 100% labeled cells did not result in identical levels of cell death induced by the different types of SPIONs. This confirmed that labeling efficiency represented an important but not the sole factor determining the response of cells to nanoparticle treatment. Similarly to cell viability, a subsequent 72 h cultivation of hBMSCs-2 without SPIONs did not lead to a mitigation of cytotoxic effects. In some cases (such as Endorem®), rather the opposite was observed,

i.e., an increase in the number of dead cells in comparison with the previous interval. Only the PLL-Endorem® particles appeared to be quite harmless from this point of view. The absence of cytotoxic effects attributable to PLL-Endorem® particles could be explained by the delayed release of free iron into the intracellular environment due to the slower degradation of their double-coating.

The levels of cell death induced by nanoparticles in hBMSCs-2 did not reflect exactly the degree to which cell viability declined. For example, the most toxic uncoated maghemite induced a 50% decrease in cell viability but killed only about 17% of the cells. This suggests that cell death *per se* was not the main cause of the SPIONs' effects on cell viability. Human BMSCs are characterized by a relatively long doubling time (about 35 h) with a certain donor

variability. In addition, their proliferating fraction is very small, representing less than 10% of the cell population provided that α -MEM with 10% BFS is used for cell culturing (Turnovcova et al., 2009). Apparently, the strong inhibition of proliferative activity rather than excessive cell death might be responsible for the long-term suppression of cell viability in hBMSCs-2.

It has been reported that the gene expression profile of hBMSCs significantly changes with age. Especially the genes involved in genomic integrity and regulation of transcription are age-repressed, which may worsen the function and regenerative potential of the cells (Wagner et al., 2009). Hence, the different responses of our two hBMSC cultures could be primarily associated with the different ages of the donors (about a 40 year difference), although the donor-related variability in the length of the cell cycle (Turnovcova et al., 2009) might play some role as well. On the other hand, it is generally accepted that the nanoparticle-protein “corona”, a dynamic layer of proteins and other biomolecules that adsorbs to nanoparticle surfaces immediately upon contact with living systems, mediates the interaction of nanoparticles with the cellular machinery rather than the material itself (Lynch et al., 2007; El-Ansary and Al-Daihan, 2009). Hence, differences in the composition of the intracellular environment due to disparate genotypes must be also taken into consideration when explaining the different responses of our hBMSC cultures.

It has been stated that the induction of high ROS levels, although perhaps not toxic to cells as such, could have long-term effects and should be considered as a hazard (Soenen et al., 2011). Indeed, not only the hBMSCs-2, but also the hBMSCs-1, resistant to the toxic action of SPIONs, showed high levels of oxidative damage to lipids, proteins and DNA as a consequence of nanoparticle exposure and, in general, no improvement occurred during the subsequent growth of cells in medium without nanoparticles. The effect was most apparent in the lipids of the exposed cells – the levels of 15-F_{2t}-isoP, serving as a marker of lipid peroxidation, exceeded the control values several-fold and markedly increased even further during the subsequent interval. This could be associated, among other things, with the accumulation of induced lesions because lipids lack fast repair mechanisms.

Radu et al., 2010 also observed an increase of lipid peroxidation in MRC-5 lung fibroblast cells exposed to α -Fe₂O₃ nanoparticles, accompanied by the depletion of reduced glutathione concentration and the augmented activity of enzymes that function as ROS scavengers. Peroxidation of lipids can disturb the assembly of the cell membrane, which in turn may cause changes in membrane fluidity and permeability, alterations of ion transport and the inhibition of metabolic processes (Nigam and Schewe, 2000). The breakdown of lipid hydroperoxides in biological systems results in the formation of a great diversity of highly reactive aldehydes that may disseminate and augment initial free radical production (Catalá, 2009). Also mitochondrial injury induced by lipid peroxidation can lead to further ROS generation and the spread of free radical reactions (Catalá, 2009). All of these events then amplify damage not only to lipids but also to proteins and DNA.

The accumulation of oxidized proteins, as a result of an imbalance between the rates of ROS formation, antioxidant levels, and the capacity to eliminate the oxidized forms of proteins by proteolysis, may affect cellular morphology and function (Catalá, 2009). Up to now, elevated levels of protein carbonyls have been associated with a number of degenerative diseases (Stadtman, 2001).

The accumulation of genetic errors as a consequence of repeated DNA insults and/or the impaired function of metabolic and DNA repair enzymes may also lead to numerous chronic diseases, including cancer (Azad et al., 2008). DNA oxidation products involve oxidized bases, abasic sites, DNA–DNA intrastrand adducts, DNA strand breaks and DNA–protein cross-links (Ferguson, 2010); the majority of these lesions are detectable by the comet assay (Møller

et al., 2000; Møller, 2005). Using this method we demonstrated the genotoxic potential of the analyzed nanoparticles regardless of their coating, although the extent of the response to particular SPIONs varied. From this point of view, only the complex of Endorem® with PLL seemed to be promising. However, due to the high levels of oxidative damage to proteins and lipids, the absence of genotoxic effects in (Endorem®+PLL)-exposed cells could be only temporary. In any case, this result should be verified using hBMSC cultures from other donors. On the other hand, PLL- γ -Fe₂O₃ particles induced in both hBMSCs-1 and hBMSCs-2 high levels of DNA-SB but did not increase the number of FPG- and ENDO III-sensitive sites. Experiments in mice have indicated that oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes exposed to long-term oxidative stress may be masked by increased repair (Risom et al., 2003, 2005). This suggests that the capacity of DNA repair in the hBMSCs treated with PLL- γ -Fe₂O₃ particles was not overloaded so that the differences between the exposed and control cells in terms of the levels of oxidized lesions were masked by the rapid removal of altered bases from the DNA. Increased levels of DNA-SB could then reflect an increased number of transient repair sites in the DNA as well as single- and double-SB resulting from unrepaired or misrepaired DNA lesions.

This study does not provide sufficient data for further speculations about the causes of the variations observed in the extent of the genotoxic effects or about the type and kinetics of the DNA lesions induced by different SPIONs in hBMSCs. The final response of a cell to nanoparticles results from a chain of events that depend upon the genetic make-up of the cell determining the specificity of the intracellular environment (e.g. the spectrum and actual levels of plasma proteins, the activity of repair enzymes, etc.), as well as upon the size and surface chemistry of the given nanoparticles. The latter may influence not only the efficiency of SPION internalization, but also the route and speed of their intracellular degradation with the subsequent release of free iron and, last but not least, the choice of particular pathways leading to ROS generation and subsequent damage to biomolecules. Moreover, the composition of the cultivation medium (for example, the content of nutrients and growth factors) may also modify the properties of nanoparticles prior to their entry into cells, as many proteins present in the medium form transient complexes with nanoparticles (Cedervall et al., 2007).

The undesirable effects of nanoparticles on the surrounding tissue are attributed, among others, to the generation of reactive oxygen species by inflammatory cells (Donaldson et al., 2010). Indeed, rats exposed directly to γ -Fe₂O₃ via an intravenous injection exhibited two weeks posttreatment signs of inflammation in the lungs, liver and kidney (Hanini et al., 2011). In contrast, long-term monitoring for up 18 weeks did not reveal any difference in the inflammatory response between animals with SPION-labeled and unlabeled grafts (Guzman et al., 2007). As regards inflammation, the administration of SPIONs in the form of an intracellular label thus seems to be without risk. Nevertheless, our present results clearly demonstrated the capability of SPIONs *per se* to induce long-term intracellular oxidative stress. Oxidative injury of biological targets, such as lipids, proteins and DNA, appeared even in the absence of cellular toxicity. This could influence therapeutic functions of hBMSCs in the host. To date, published results from *in vivo* experiments have been, in general, very promising as SPION-labeled cells migrated in the host to the site of the lesion, differentiated there in an appropriate manner, and improved the functional outcome of the injured animal (Jendelova et al., 2003; Zhang et al., 2003; Urdzikova et al., 2006). Also, the secretion profile of ferumoxide-labeled hBMSCs did not seem to be impaired, including the production of growth factors and cytokines mediating the recovery effect (van Buul et al., 2011). On the other hand, Feridex labeling blocked *in vitro* the chondrogenic activity of mesenchymal stem cells while adipogenic and osteogenic differentiation

proceeded without problems (Kostura et al., 2004). This effect appeared to be dose-dependent because halving the Feridex concentration induced limited chondrogenesis (Kostura et al., 2004). Along with our results, this implies that the intracellular concentrations of SPIONs are still too high. In our experiments, the amount of iron is 14.6–51.7 pg/cell depending on the nanoparticle coating (Babic et al., 2008, 2009; Horak et al., 2009), which is comparable with Kostura's experiments (13–16 pg Fe/cell), while a concentration about one order of magnitude lower (1.4–3.0 pg Fe/cell) seems to be sufficient for detection with MRI (Heyn et al., 2005). Hong et al. (2011) conclude from their experiments on murine fibroblast cell line L-929 that doses of SPIONs below 100 ppm ($\mu\text{g/ml}$) rarely show genotoxicity but more careful investigation is required above 200 ppm. From this point of view, the concentrations of commercial SPIONs (Resovist® or Endorem®) that were used in *in vivo* experiments for labeling transplanted cells cover a wide range of doses from 5.6 μg of iron/ml (Guo et al., 2011) to 110 μg of iron/ml (Jendelova et al., 2004) and 140 μg of iron/ml (Herynek et al., 2011; Park et al., 2011) that fall within a range of biologically safe doses. However, our results based upon cells with therapeutic potential suggest that even a dose around 15 μg of iron/ml (*i.e.*, on the low side of the range) could represent an increased risk of oxidative damage to biological macromolecules, particularly to lipids.

Hence, decreasing the intracellular label concentration to the minimum necessary for MRI could improve the safety of nanoparticles for biomedical applications. Attention should be simultaneously paid to the possible consequences of oxidative stress under *in vivo* conditions. This should involve parallel monitoring of oxidative damage to DNA, lipids and proteins in the injured tissue regenerating after the transplantation of labeled or unlabeled cells, as well as in the healthy tissues of treated animals. In addition, *in vivo* experiments could also confirm or exclude an inflammatory response as a possible source of cell oxidative injury.

Conflict of interest

We declare here no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the grants AV0Z50390703, AV0Z50390512, 1M0538, GA CR 309/08/H079, GA CR 203/09/1242 and GA CR P304/12/1370. We thank Katarina Masinova for TEM images and James Dutt for critical reading of the manuscript.

References

- Allen, M.J., MacRenaris, K.W., Venkatasubramanian, P.N., Meade, T.J., 2004. Cellular delivery of MRI contrast agents. *Chem. Biol.* 11, 301–307.
- Arbab, A.S., Bashaw, L.A., Miller, B.R., Jordan, E.K., Bulte, J.W., Frank, J.A., 2003a. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 76, 1123–1130.
- Arab, A.S., Bashaw, L.A., Miller, B.R., Jordán, E.K., Lewis, B.K., Kalish, H., Frank, J.A., 2003b. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 229, 838–846.
- Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 11, 1–15.
- Babic, M., Horak, D., Jendelova, P., Glogarova, K., Herynek, V., Trchova, M., Likavcanova, K., Lesny, P., Pollert, E., Hajek, M., Sykova, E., 2009. Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* 20, 283–294.
- Babic, M., Horak, D., Trchova, M., Jendelova, P., Glogarova, K., Lesny, P., Herynek, V., Hajek, M., Sykova, E., 2008. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* 19, 740–745.
- Bos, C., Delmas, Y., Desmoulière, A., Solanilla, A., Hauger, O., Grosset, C., Dubus, I., Ivanovic, Z., Rosenbaum, J., Charbord, P., Combe, C., Bulte, J.W., Moonen, C.T., Ripoche, J., Grenier, N., 2004. *In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* 233, 781–789.
- Bulte, J.W., Souhals, T., Witwer, B., Zhang, S.C., Trable, E., Lewis, B.K., Zywicke, H., Miller, B., van Gelderen, P., Moskowitz, B.M., Duncan, I.D., Frank, J.A., 2001. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and *in vivo* tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1141–1147.
- Bulte, J.W., Zhang, S., van Gelderen, P., Herynek, V., Jordan, E.K., Duncan, I.D., Frank, J.A., 1999. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15256–15261.
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1–11.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A., Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2050–2055.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261.
- Cracowski, J.L., Durand, T., Bessard, G., 2002. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 360–366.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., 1998. Measurement of apoptosis. In: Scheper, T. (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 62. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 34–73.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Donaldson, K., Poland, C.A., Schins, R.P., 2010. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* 4, 414–4120.
- Dusinska, M., Fjellsbø, L., Magdolenova, Z., Rinna, A., Runden Pran, E., Bartonova, A., Heimstad, E., Harju, M., Tran, L., et al., 2009. Testing strategies for the safety of nanoparticles used in medical applications. *Nanomedicine* 4, 605–607.
- El-Ansary, A., Al-Daihan, S., 2009. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. *J. Toxicol.* 2009, 1–9.
- Ferguson, L.R., 2010. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat. Res.* 690, 3–11.
- Frank, J.A., Miller, B.R., Arbab, A.S., Zywicke, H.A., Jordan, E.K., Lewis, B.K., Bryant Jr., L.H., Bulte, J.W., 2003. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 228, 480–487.
- Guo, J., Shen, J.K., Wang, L., Xiao, L., Zhang, R.J., Luo, W.F., Gong, Z.G., Sun, J., Xu, H., Sirois, P., Li, K., 2011. *In vivo* evaluation of cerebral transplantation of resovist-labeled bone marrow stromal cells in Parkinson's disease rats using magnetic resonance imaging. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 636–648.
- Gupta, A.K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995–4021.
- Gupta, A.K., Naregalkar, R.R., Vaidya, V.D., Gupta, M., 2007. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)* 2, 23–39.
- Guzman, R., Uchida, N., Bliss, T.M., He, D., Christopherson, K.K., Stellwagen, D., Capela, A., Greve, J., Malenka, R.C., Moseley, M.E., Palmer, T.D., Steinberg, G.K., 2007. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10211–10216.
- Hanini, A., Schmitt, A., Kacem, K., Chau, F., Ammar, S., Gavard, J., 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int. J. Nanomed.* 6, 787–794.
- Harper, S., Usenko, C., Hutchison, J.E., Maddux, B.L.S., Tanguay, R.L., 2008. *In vivo* biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *J. Exp. Nanosci.* 3, 195–206.
- Hejcl, A., Lesny, P., Pradny, M., Michalek, J., Jendelova, P., Stulik, J., Sykova, E., 2008. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiol. Res.* 57, S121–S132.
- Hejcl, A., Sedy, J., Kapcalova, M., Toro, D.A., Amemori, T., Lesny, P., Likavcanova-Masinova, K., Krumbholcova, E., Pradny, M., Michalek, J., Burian, M., Hajek, M., Jendelova, P., Sykova, E., 2010. HPMAR-GD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 19, 1535–1546.
- Herynek, V., Berkova, Z., Dovolilova, E., Jirak, D., Kriz, J., Girman, P., Saudek, F., Hajek, M., 2011. Improved detection of pancreatic islets *in vivo* using double contrast. *Contrast Media Mol. Imaging* 6, 308–313.
- Heyn, C., Bowen, C.V., Rutt, B.K., Foster, P.J., 2005. Detection threshold of single SPION-labeled cells with FIESTA. *Magn. Reson. Med.* 53, 312–320.
- Hong, S.C., Lee, J.H., Lee, J., Kim, H.Y., Park, J.Y., Cho, J., Lee, J., Han, D.W., 2011. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int. J. Nanomed.* 6, 3219–3231.
- Horak, D., Babic, M., Jendelova, P., Herynek, V., Trchova, M., Likavcanova, K., Kapcalova, M., Hajek, M., Sykova, E., 2009. Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling. *J. Magn. Mater.* 321, 1539–1547.
- Horak, D., Babic, M., Jendelova, P., Herynek, V., Trchova, M., Pientka, Z., Pollert, E., Hajek, M., Sykova, E., 2007. D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* 18, 635–644.

- Chevion, M., Berenshtein, E., Stadtman, E.R., 2000. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* 33, S99–S108.
- Jendelova, P., Herynek, V., DeCros, J., Glogarova, K., Andersson, B., Hajek, M., Sykova, E., 2003. Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 50, 767–776.
- Jendelova, P., Urdzikova, L., Glogarova, K., Kroupova, J., Bryja, V., Andersson, B., Burian, M., Hajek, M., Sykova, E., 2004. MR tracking of transplanted bone marrow and embryonal stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 76, 232–243.
- Karlsson, H.L., 2010. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 651–666.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Möller, L., 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* 188, 112–118.
- Kostura, L., Kraitchman, D.L., Mackay, A.M., Pittenger, M.F., Bulte, J.W., 2004. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* 17, 513–517.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger, J., 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–377.
- Kubinova, S., Sykova, E., 2010. Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* 19, 144–156.
- Landsiedel, R., Kapp, M.D., Schulz, M., Wiench, K., Oesch, F., 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. *Mutat. Res.* 681, 241–258.
- Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Kroll, A., Hahn, D., Schnekenburger, J., Wiench, K., Wohlleben, W., 2010. Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv. Mater.* 22, 2601–2627.
- Lu, A.H., Salabas, E.L., Schüth, F., 2007. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 1222–1244.
- Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., Dawson, K.A., 2007. The nanoparticle–protein complex as a biological entity: a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* 134–135, 167–174.
- McCarthy, J.R., Kelly, K.A., Sun, E.Y., Weissleder, R., 2007. Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2, 153–167.
- Møller, P., 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96 (Suppl. 1), 1–42.
- Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H., 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 1005–1015.
- Montzka, K., Führmann, T., Müller-Ehmsen, J., Wöltje, M., Brook, G.A., 2010. Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro model of tissue damage. *Cytotherapy* 12, 870–880.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627.
- Nigam, S., Schewe, T., 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 167–181.
- Novotna, B., Topinka, J., Solansky, I., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Sram, R.J., 2007. Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicol. Lett.* 172, 37–47.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Park, K.S., Lee, H.S., Kim, Y.S., Kang, T.M., Lee, J.H., Joh, J.W., Kim, S.J., 2011. Improved quantification of islet transplants by magnetic resonance imaging with Resovist. *Pancreas* 40, 911–919.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Radu, M., Munteanu, M.C., Petrache, S., Serban, A.I., Dinu, D., Hermenean, A., Sima, C., Dinischiotu, A., 2010. Depletion of intracellular glutathione and increased lipid peroxidation mediate cytotoxicity of hematite nanoparticles in MRC-5 cells. *Biochim. Pol.* 57, 355–360.
- Risom, L., Dybdahl, M., Bomholdt, J., Vogel, U., Wallin, H., Møller, P., Loft, S., 2003. Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* 24, 1847–1852.
- Risom, L., Møller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 592, 119–137.
- Rossner Jr., P., Svecova, V., Milcova, A., Lnenickova, Z., Solansky, I., Santella, R.M., Sram, R.J., 2007. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutat. Res.* 617, 23–32.
- Shubayev, V.I., Pisanic 2nd., T.R., Jin, S., 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 61, 467–477.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.I., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Soenen, S.J., Himmelreich, U., Nuytten, N., De Cuyper, M., 2011. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials* 32, 195–205.
- Soenen, S.J., Nuytten, N., De Meyer, S.F., De Smedt, S.C., De Cuyper, M., 2010. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 6, 832–842.
- Stadtman, E.R., 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 928, 22–38.
- Suzuki, Y., Zhang, S., Kundu, P., Yeung, A.C., Robbins, R.C., Yang, P.C., 2007. In vitro comparison of the biological effects of three transfection methods for magnetically labeling mouse embryonic stem cells with ferumoxides. *Magn. Reson. Med.* 57, 1173–1179.
- Sykova, E., Jendelova, P., 2006. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener. Dis.* 3, 62–67.
- Sykova, E., Jendelova, P., 2007. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 161, 367–433.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Turnovcova, K., Ruzickova, K., Vanecek, V., Sykova, E., Jendelova, P., 2009. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy* 11, 874–885.
- Urdzikova, L., Jendelova, P., Glogarova, K., Burian, M., Hajek, M., Sykova, E., 2006. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma* 23, 1379–1391.
- van Buul, G.M., Kotek, G., Wielopolski, P.A., Farrell, E., Bos, P.K., Weinans, H., Grohnert, A.U., Jahr, H., Verhaar, J.A., Krestin, G.P., van Osch, G.J., Bernsen, M.R., 2011. Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides. *PLoS One* 6, e17001.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.X., Eckstein, V., Boukamp, P., Ho, A.D., 2009. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4, e5846.
- Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C., Gazeau, F., 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24, 1001–1011.
- Zhang, Y., Zhang, J., 2005. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *J. Colloid Interface Sci.* 283, 352–357.
- Zhang, Z.G., Jiang, Q., Zhang, R., Zhang, L., Wang, L., Zhang, L., Arniago, P., Ho, K.L., Chopp, M., 2003. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann. Neurol.* 53, 259–263.

Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications

Nataliya Chekina,^a Daniel Horák,^{*ab} Pavla Jendelová,^{bc} Miroslava Trchová,^a Milan J. Beneš,^a Martin Hrubý,^a Vít Herynek,^{bd} Karolina Turnovcová^c and Eva Syková^{bc}

Received 11th February 2011, Accepted 21st March 2011

DOI: 10.1039/c1jm10621j

The simultaneous combination of optical and magnetic resonance imaging (MRI) would greatly benefit *in vivo* disease diagnosis as well as *in situ* monitoring of living cells. In order to design dual detection of cells involving simultaneous imaging by fluorescent microscopy and MRI, nanoparticles with two reporters, a fluorescent dye and a superparamagnetic core, included in one particle were synthesized and characterized. The γ -Fe₂O₃ nanoparticles obtained by coprecipitation and oxidation were coated with silica (SiO₂) or carboxymethyl chitosan (CMCS) and labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). The fluorescent label was covalently bound to the nanoparticles and was not quenched by the iron oxide core. The nanoparticles successfully labeled rat mesenchymal stem cells (rMSCs) *in vitro*. Relaxation time measurements found large amounts of iron inside the cells with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles. Both MR and fluorescent imaging of a rat brain with implanted rMSCs labeled with FITC-labeled CMCS-modified silica-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles were performed.

1. Introduction

Magnetic nanoparticles play an increasingly important role in science and technology.^{1,2} Since they are nontoxic and biodegradable, they are widely used in biology and medicine for imaging,^{3,4} cell tracking,⁵ drug and siRNA delivery,^{6,7} hyperthermia,^{8,9} magnetic separation^{10,11} and bio- and chemo-sensing.¹² To improve the efficiency and versatility of nanomaterials in numerous applications, hybrid magnetic nanoparticles incorporating multiple functionalities are being developed. With regard to cell labeling, there is a focus on materials that possess both fluorescent and magnetic properties so that they can be monitored not only by MRI, but also by fluorescent spectroscopy.^{13–23} Optical techniques offer improved high spatial resolution allowing the visualization of cell structures.²⁴ They are used for the simultaneous visualization of multiple modalities with two or more fluorescent probes with different spectra, but have limited depth of imaging and poor absolute quantitative accuracy due to the absorption of light in tissues. Magnetic imaging has no practical limitation in terms of the depth of imaging; however, spatial resolution is worse and imaging with more than one probe is problematic. A combination of multiple

imaging technologies, such as magnetic and optical imaging, provides complementary information about the imaged object.

Fluorescent magnetic nanocomposites include a variety of materials based on a magnetic core coated with an inorganic compound or organic polymer with a bound or embedded²⁵ fluorophore (quantum dots,²⁶ organic dyes,¹⁵ conjugated polymers, and Eu complexes^{16,27}). Since quantum dots contain toxic elements such as cadmium or selenium, dye-conjugated magnetic particles are preferred for *in vivo* applications. The preparation of fluorescent magnetic nanoparticles is, however, challenging. Problems are also associated with their low chemical stability and the aggregation of the nanoparticles in solution. Aggregation is caused by magnetic, electrostatic, hydrophobic or chemical interactions between the particles. A specific difficulty in the preparation of fluorescent magnetic nanoparticles is the risk of quenching of the fluorophore on the particle surface by the magnetic core. This problem has been solved by coating the magnetic core with a stable isolating shell prior to the introduction of the fluorescent molecule or by attaching an appropriate spacer to the fluorophore. Most fluorescent magnetic nanoparticles thus have a core-shell structure.¹⁵ The shell has to be biocompatible and non-immunogenic, preventing the agglomeration of the particles and at the same time minimizing non-specific interactions with proteins, cells and other components of biological media.

A convenient coating of magnetic cores is based on their silanization with tetraethoxysilane and/or its functional derivatives for binding a fluorophore.²⁸ The silica shell serves as an inert, biocompatible protective coating. Moreover, it improves the colloidal stability of particles in aqueous media, is easy to prepare and is optically transparent. A properly functionalized

^aInstitute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovský Sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic. E-mail: horak@imc.cas.cz

^bCenter for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, V Úvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

^cInstitute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

^dInstitute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic

silica shell has the ability to incorporate not only a fluorescent label, but also other functional molecules, such as biological species.^{29,30} Sol–gel methods using tetraethoxysilane (TEOS) are generally used to produce coatings of controlled thickness.³¹ Functional silanes, such as (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), then allow the introduction of reactive groups to the core–shell structures. However, the non-degradability of the silica limits its *in vivo* biomedical use.³²

Another alternative for the preparation of multimodal fluorescent magnetic nanoparticles involves coating the magnetic cores with polysaccharides, such as dextran, chitosan or their derivatives, followed by the attachment of a label. Due to its biocompatibility and biodegradability, chitosan (CS)^{33–35} has been widely used in tissue engineering and controlled drug and gene delivery.^{36,37} CS is blood compatible and enhances interactions with the cell membrane,³⁸ which may facilitate the uptake of carboxymethyl chitosan (CMCS)-coated magnetic nanoparticles by cells. CMCS has chelating groups (causing strong interactions with magnetic oxide and thus binding to it) and amphiphilic properties.³⁹ The carboxymethylation of chitosan enables its solubility in water at neutral and alkaline pH, allowing the introduction of additional functional groups for chemical bonding of fluorescent labels.⁴⁰

The aim of this work was to design, prepare and characterize new dual-marker particles, simultaneously combining both fluorescent and magnetic properties in one entity. Such bimodal fluorescent/magnetic nanoparticles have potential applications in biotechnology and nanomedicine. As a fluorescent label, fluorescein isothiocyanate (FITC) has been chosen, as it allows facile labeling of various structures. FITC has often been used in laser-induced fluorescence detection techniques and flow cytometry for protein labeling^{41,42} as well as imaging and separation of chiral amino acids.^{43,44} The advantage of fluorescein is that its emission intensity is pH-dependent. Fluorescence strongly increases⁴⁵ in the pH range 5–8, where the fluorescent magnetic nanoparticles may serve as a “smart” pH-sensing fluorescent probe for functional imaging. In normal tissue and the bloodstream, the pH is 7.4 and the fluorescence intensity is high. In contrast, in tumors or inflamed tissue, which are slightly acidic (pH *ca.* 6.5) due to hypoxic conditions, fluorescence intensity is low; after internalization of the particles into cells, the pH drops even further to *ca.* 5 in late endosomes.⁴⁶ This offers a unique possibility to simultaneously follow both the biodistribution of the particles using magnetic resonance imaging (MRI) and the pH of the surrounding microenvironment of the nanoparticles, *e.g.*, in tumors or inflammatory lesions.

2. Experimental

2.1. Materials

Iron(II) chloride tetrahydrate and iron(III) chloride hexahydrate, (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), fluorescein isothiocyanate (FITC) and phosphate buffer solution (PBS) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Ammonium hydroxide, sodium hydroxide, propan-2-ol and ethanol (99.8%) were obtained from Lach-Ner (Neratovice,

Czech Republic). Chitosan (CS; middle viscous), monochloroacetic acid and tetraethoxysilane (TEOS) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); sodium citrate dihydrate was from Lachema (Brno, Czech Republic). The contrast agent Endorem® was from Guerbet (Roissy, France). All other chemicals were from Aldrich. Ultrapure Q-water ultrafiltered on a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Molsheim, France) was used for the preparation of solutions.

2.2. Preparation of γ -Fe₂O₃ nanoparticles

Iron oxide nanoparticles were prepared by a modified method according to an earlier published procedure,⁴⁷ in which colloidal Fe(OH)₃ was precipitated from FeCl₃·6H₂O added to less than an equimolar amount of ammonia; this was followed by the addition of FeCl₂·4H₂O at a molar ratio Fe(III)/Fe(II) = 2. Briefly, 0.2 M FeCl₃·6H₂O aqueous solution (100 mL) was mixed with 0.5 M NH₄OH solution (100 mL) under sonication (Digital Sonifier 250; Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) at 40 W and laboratory temperature for 5 min to form the Fe(OH)₃ colloid. Then, 0.2 M FeCl₂·4H₂O aqueous solution (50 mL) was added under sonication (5 min) and the mixture poured into 0.5 M NH₄OH aqueous solution (300 mL). The resulting magnetite coagulate was left to grow for 30 min, magnetically separated, and repeatedly (7 times) washed with Q-water to remove all impurities (including NH₄Cl) remaining after the synthesis. The above formed pure magnetite was sonicated for 5 min with 0.1 M sodium citrate solution (16 mL) and oxidized at room temperature with 5 wt% sodium hypochlorite (13 mL) to maghemite (γ -Fe₂O₃). The precipitate was again repeatedly (seven times) washed with Q-water using magnetic separation/decantation to obtain a stable colloid.

2.3. Synthesis of carboxymethyl chitosan (CMCS)

A slight modification of a previously described procedure was used for the preparation of carboxymethyl chitosan.^{40,48} Briefly, CS (10 g) was swelled in propan-2-ol/water (80/20, v/v) mixture (100 mL), sodium hydroxide (15 g, 375 mmol) was added, and the reaction proceeded at 60 °C for 1 h. A solution of chloroacetic acid (15 g, 159 mmol) in propan-2-ol (20 mL) was added dropwise to the reaction mixture over 30 min, and the reaction proceeded at 60 °C for 4 h. The reaction was cooled, diluted by the addition of 95% ethanol (200 mL) and the NaCl precipitate was filtered-off. Water (500 mL) and 2.5 M HCl (5 mL) were then added to reach pH 7. Unreacted CS was removed after centrifugation (1000 rpm) for 10 min. The volume of the supernatant was reduced to 100 mL by evaporation under vacuum, and 99.8% ethanol (400 mL) was added to precipitate the CMCS. Finally, the CMCS was filtered, washed three times with 99.8% ethanol and dried in a vacuum oven at 50 °C.

2.4. Surface modification of γ -Fe₂O₃ nanoparticles

2.4.1. Preparation of γ -Fe₂O₃–SiO₂ nanoparticles. The above-prepared magnetic iron oxide nanoparticles were coated with silica according to an earlier report.⁴⁹ The γ -Fe₂O₃ nanoparticles (2 g) were dispersed in water (60 mL), the pH of the dispersion was adjusted to 11 by the addition of 25% ammonium hydroxide solution and a solution of TEOS (2.5 mL) in ethanol

(25.5 mL) was added. The mixture was stirred for 18 h at 23 °C to hydrolyze the TEOS and to attach the silica on the iron oxide surface. The resulting $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ nanoparticles were washed six times with Q-water using magnetic separation/decantation.

2.4.2. Preparation of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ nanoparticles. The silica-coated nanoparticles were dispersed in Q-water (100 mL), a solution of APTES (2.63 g, *i.e.*, 50 μmol per m^2 of the nanoparticle surface) in ethanol (100 mL) was added and the pH of the mixture was adjusted to 11 by several drops of 40 wt% KOH aqueous solution. The reaction mixture was then heated at 50 °C for 5 h under stirring (350 rpm). After cooling, the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ nanoparticles were washed six times with Q-water using magnetic separation/decantation to remove any unbound APTES from the dispersion.

2.5. Immobilization of CMCS on the surface of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles

2.5.1. Preparation of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$ nanoparticles. To bind CMCS on the surface of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles, the nanoparticles (10 mg) were dispersed in an aqueous solution of CMCS (10 mL water; 0.2 mg CMCS per mL; pH 7.4) at room temperature for 12 h under stirring. The resulting $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$ nanoparticles were washed three times with Q-water using magnetic separation/decantation to remove any non-adsorbed CMCS from the dispersion.

2.5.2. Preparation of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$ nanoparticles. Alternatively, the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ nanoparticles (50 mg) were added to a solution of CMCS (25 mg), EDC (30 mg) and sulfo-NHS (10 mg) in 0.1 M MES buffer (10 mL; pH 6.5). The mixture was sonicated at 40 W and 4 °C for 10 min and shaken at room temperature for 24 h. The $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$ nanoparticles were magnetically separated and washed with a MES buffer.

2.5.3. Preparation of fluorescent $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles were prepared according to the method reported in the literature.⁵⁰ Briefly, a solution of FITC (3 mg) in an acetone/water mixture (0.3/2.7, v/v) was added to a dispersion of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$ or $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$ nanoparticles (10 mg) in PBS (10 mL; pH 7.4). The reaction proceeded for 12 h at 23 °C in the dark. The FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles were magnetically separated and washed five times with PBS (pH 7.4) to remove non-conjugated FITC.

2.6. Characterization

Magnetic nanoparticles were observed in a Tecnai Spirit G² transmission electron microscope (TEM; FEI, Brno, Czech Republic). Size and polydispersity ($\text{PDI} = D_w/D_n$, where D_w and D_n are the weight- and number-average particle diameters, respectively) were determined from micrographs using Atlas image analysis software (Tescan, Brno, Czech Republic). The iron content in the microspheres was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS, Perkin-Elmer 3110) of an extract from the sample obtained with dilute HCl (1 : 1) at 80 °C for 1 h.

The concentration of APTES on the surface of the iron oxide nanoparticles was determined by CHN elemental analysis.

A Thermo Nicolet NEXUS 870 FTIR Spectrometer (Madison, WI, USA) in an H₂O-purged environment with a DTGS detector was used to measure the infrared spectra over a wavelength range of 400 to 4000 cm^{-1} . A MKII Golden GateTM Heated Diamond ATR Top-Plate (Specac, Orpington, Great Britain) was used to measure the spectra of powdered samples by reflection ATR spectroscopy. Typical parameters were 256 sample scans, resolution 4 cm^{-1} , Happ-Genzel apodization and KBr beamsplitter.

The fluorescence spectra of FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles were measured by a Jasco FP 6200 spectrofluorimeter (Jasco Analytical Instruments, Easton, MD, USA).

2.7. Cell experiments with fluorescent magnetic nanoparticles

2.7.1. Cell experiments. As a model for testing cell viability and labeling efficiency, rat mesenchymal stem cells (rMSCs) were used. The cells were isolated from rat femur bones as described elsewhere.⁵¹ Cells from passages 2–4 were labeled by adding a suspension of FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ nanoparticles, FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$ nanoparticles or FITC-labeled $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$ nanoparticles at a concentration of 22 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ per mL to the cultivation media (DMEM, 10% fetal bovine serum and 2% Primocin) for 72 h. As a control, a commercial contrast agent, dextran-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Endorem®, was used. At the end of the labeling experiment, the cells were harvested and counted in a Bürker chamber. Viability was determined using the trypan blue exclusion test, which determines the number of viable cells present in a cell suspension. The test is based on the principle that live cells possess intact cell membranes that exclude certain dyes, such as trypan blue, whereas dead cells do not.⁵²

2.7.2. Labeling efficiency and staining intensity. Labeling efficiency was determined by manually counting the number of Prussian Blue-stained and unstained cells in 12-well plates. Ten optical fields from each well were scanned using an Axioplan Imaging II microscope at 100 \times magnification using a 10 \times /0.75 objective lens, an AxioCam digital camera and AxioVision 4 software (microscope setup from Zeiss, Oberkochen, Germany). All cells in the scanned images were manually labeled as Prussian Blue-stained or unstained using Jasc Paint Shop Pro 8 (Corel Corporation, Ottawa, Canada). The scanned images with manually labeled cells were processed by the Image analysis toolbox of MATLAB software (The MathWorks, MA, USA). The presence or absence of a label inside the cells was expressed as the percentage of labeled cells. To check the intensity of fluorescent staining, an Axioplan Imaging II fluorescent microscope was used at a magnification of 200 \times . Data were analyzed for statistical significance with analysis of variance (ANOVA) using the Origin program, version 8.0988 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA).

2.8. *In vitro* MR relaxometry

T_2 relaxation times were measured at two fields: at 0.5 T using a Bruker MiniSpec relaxometer and at 4.7 T using a Bruker

BioSpec spectrometer (Ettingen, Germany). The relaxivities r_2 (reciprocal values of relaxation times related to the concentration c , i.e., $1/T_2/c$) of the fluorescent magnetic particles dispersed in gelatin and the relaxation rates R_2 of the rMSCs (i.e., $1/T_2/\text{cell number in 1 mL}$) labeled with such particles were calculated at both fields. The contribution of the gelatin and/or unlabeled cells was deducted.

The amount of iron inside the cells was evaluated by comparing the relaxivity of a sample with labeled cells to calibration samples containing pure contrast agent at known concentrations in gelatin. As this method does not reflect the possible aggregation of nanoparticles inside the cells, which may significantly alter relaxation times, the calculated average amount of iron inside the cells is underestimated and should be considered as a rough estimate only. As the nanoparticles are superparamagnetic, they exhibit strong T_2 and moderate T_1 effect (ratio $r_2/r_1 = 20.7 \pm 1.2$ at 0.5 T), and are dedicated primarily for contrast enhancement in T_2 - (or T_2^*) weighted images. Due to strong T_2^* they are unsuitable for T_1 -weighted imaging. Therefore, only r_2 relaxivities and R_2 relaxation rates are presented.

2.9. MR imaging

In vivo MR images of grafted labeled cells in the rat brain were obtained using a 4.7 T Bruker spectrometer equipped with a homemade surface coil. The rats were anesthetized by passive inhalation of 1.5–2% isoflurane in air. Breathing was monitored during the measurements. Single sagittal, coronal and transversal images were obtained by a fast gradient echo sequence for localizing the subsequent T_2 -weighted turbo-spin echo sequence in the coronal and transversal planes. Sequence parameters were: repetition time TR = 3000 ms, effective echo time TE = 36 ms, number of acquisitions AC = 8, matrix size 256×256 , field of view FOV = 3.5×3.5 cm, the slice thickness was 0.85 mm. All experiments with rats were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines. The institutional committee has approved the experiments.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles

At the beginning, *ca.* 9 nm $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with a relatively narrow polydispersity (PDI = 1.25) were obtained by the chemical coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) chloride with ammonium hydroxide and oxidation with sodium hypochlorite (Fig. 1(a)). The nanoparticles were stabilized using sodium citrate.

Two approaches for binding a fluorescent label on coated magnetic nanoparticles were used. The first one was two-step silanization by TEOS followed by APTES catalyzed by ammonium hydroxide^{53,54} to introduce the amino groups necessary for ligand attachment (Scheme 1). In the second method, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ or $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP}$ nanoparticles were coated with CMCS and FITC immobilized. Silane was covalently attached to the iron oxide surface by the reaction between the hydroxyl groups of hydrolyzed TEOS and the hydroxyl groups on the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ surface. The resulting *ca.* 13 nm $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles had a *ca.* 3 nm thick continuous silica shell on the surface (Fig. 1(b)). Coating

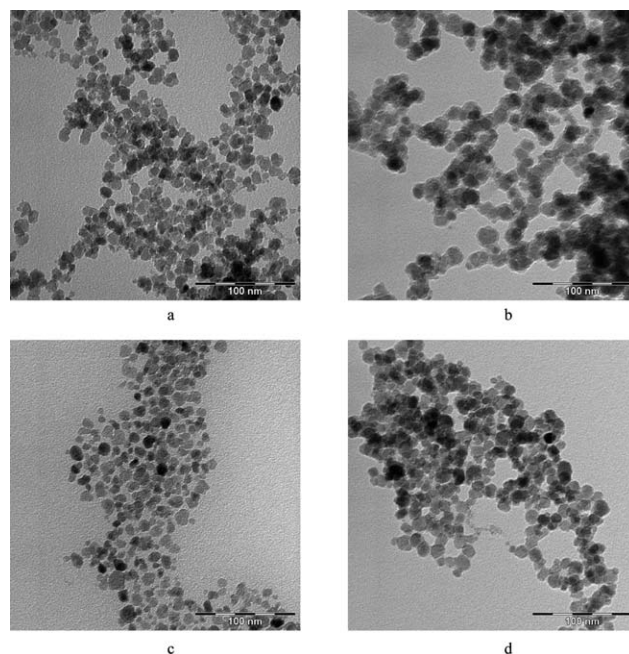
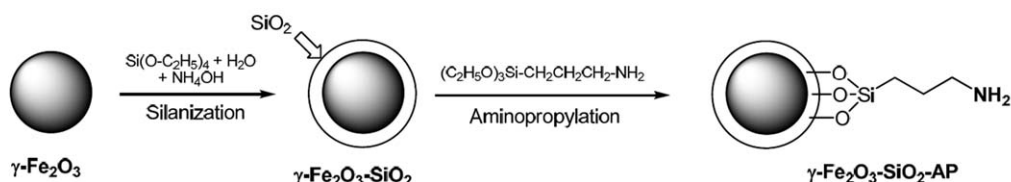


Fig. 1 TEM micrographs of (a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles, (b) silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles, (c) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCS}$ nanoparticles and (d) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-AP-CMCS}$ nanoparticles.

did not change the polydispersity of the nanoparticles (PDI = 1.14). Several factors, such as pH, temperature and APTES concentration in the feed, influence the efficiency of the modification. The surface charge of the nanoparticles is determined by the pH of the reaction mixture and by the selection of the catalyst for APTES hydrolysis. No amino groups were observed on the surface of the silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles at pH 3. APTES modification of silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles was thus performed under alkaline conditions (pH = 11) at 50 °C, which accelerated the reaction compared to room temperature. This is in accordance with claims in the literature that the optimal conditions for such a synthesis require alkaline catalysis.⁴⁹ The concentrations of APTES in the reaction feed were varied from 50 to 100 $\mu\text{mol m}^{-2}$ of silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles (Table 1). If 50 μmol of APTES per m^2 was added in the reaction feed, 3.6 μmol of APTES was found per m^2 of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ surface, corresponding to 2.2 APTES molecules per nm^2 . Increasing the APTES concentration in the reaction feed up to 75 or 100 $\mu\text{mol m}^{-2}$ resulted in greater coverage of the silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticle surface with APTES, up to 6.5 and 7.0 $\mu\text{mol m}^{-2}$ which corresponds to 3.9 and 4.2 APTES molecules per nm^2 , respectively. This suggests that silica was present on the surface of the nanoparticles.⁵³

3.2. Preparation of CMCS-modified $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles

In order to compare silica-coated $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with another type of magnetic particle, CMCS was also selected as a coating of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. CMCS was prepared by carboxymethylation. Alkylation can theoretically proceed on N or O atoms with the first reaction being generally preferred due to higher nucleophilicity. However, NMR results confirmed that the oxygen atom on C6 of chitosan was alkylated predominantly,



Scheme 1 Silanization of γ -Fe₂O₃ nanoparticles with TEOS and subsequent modification with APTES.

Table 1 Effect of the APTES concentration in the feed on the surface concentration of APTES on silica-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles

APTES in the feed/ $\mu\text{mol m}^{-2}$	Surface concentration of APTES on silica-coated γ -Fe ₂ O ₃ nanoparticles/ $\mu\text{mol m}^{-2}$
50	3.6
75	6.5
100	7

^a According to elemental analysis.

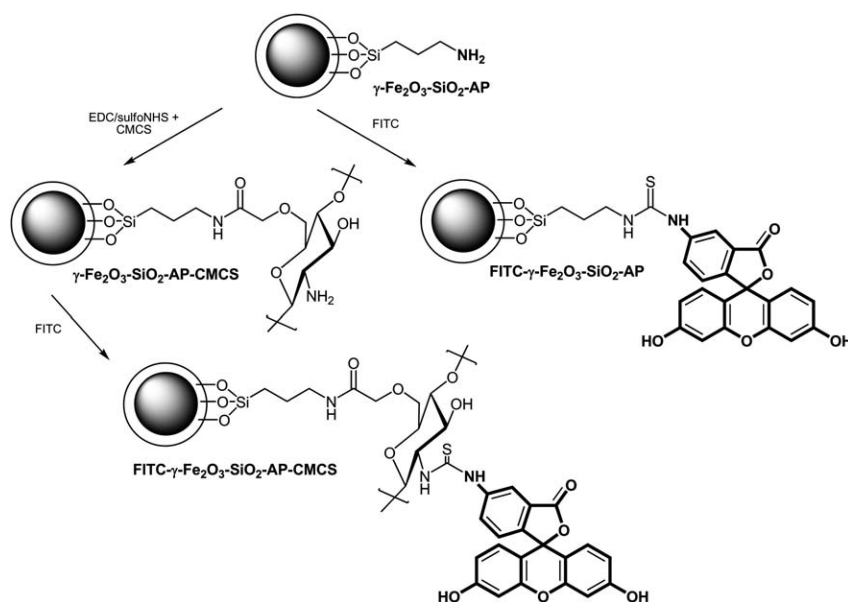
while the nitrogen atom only negligibly.⁴⁰ CMCS not only ensured the colloidal stability of the resulting nanoparticles, but its advantage consisted in its biodegradability and biocompatibility, which are of key importance for potential applications in human medicine. CMCS was coupled to the γ -Fe₂O₃ nanoparticles by two approaches: (i) coordination adsorption onto their surface *via* multiple carboxyls and their imino(di)acetate moieties or (ii) covalent attachment to the NH₂ groups of γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles (Scheme 2). According to TEM micrographs, both the γ -Fe₂O₃-CMCS and γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles were almost spherical (Fig. 1(c) and (d)). The mean particle diameter was 9 nm with PDI = 1.17 for γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles and 9.3 nm with PDI = 1.15 for γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles. Even though the CMCS shell was not contrasted in the TEM micrographs of γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles, the particles were well separated from each

other, thus suggesting a protective effect of the CMCS shell (Fig. 1(c)). In contrast, γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles (Fig. 1(d)) resembled the γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles (Fig. 1(b)). The thickness of the shell was also estimated to be 3 nm.

Atomic absorption spectroscopy was used to determine the iron content in neat γ -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP, γ -Fe₂O₃-CMCS and γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles. While the iron content in neat γ -Fe₂O₃ nanoparticles was high (69 wt%), it was lower in γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP, γ -Fe₂O₃-CMCS and γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, reaching 44, 48 and 36 wt% of Fe, respectively. This indicated the presence of silica or chitosan shells on the γ -Fe₂O₃ cores. The surface modification of γ -Fe₂O₃ nanoparticles was also analyzed by elemental analysis. Both the carbon and nitrogen content in γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles were lower (2.5 and 0.6 wt%, respectively) than in γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles (6.3 and 1.3 wt%, respectively). This can be ascribed to the presence of the CMCS layer on the surface of the γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles.

3.3. ATR FTIR spectroscopy of γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP and CMCS-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles

The ATR FTIR spectra of surface-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles were compared with those of CS, CMCS and neat γ -Fe₂O₃ (Fig. 2). The spectrum of CS had characteristic peaks at 1648 cm⁻¹ (amide I), 1590 cm⁻¹ (N-H bending) and 1080 cm⁻¹ (C-O stretching)^{40,55}



Scheme 2 Labeling of γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP and γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles with FITC.

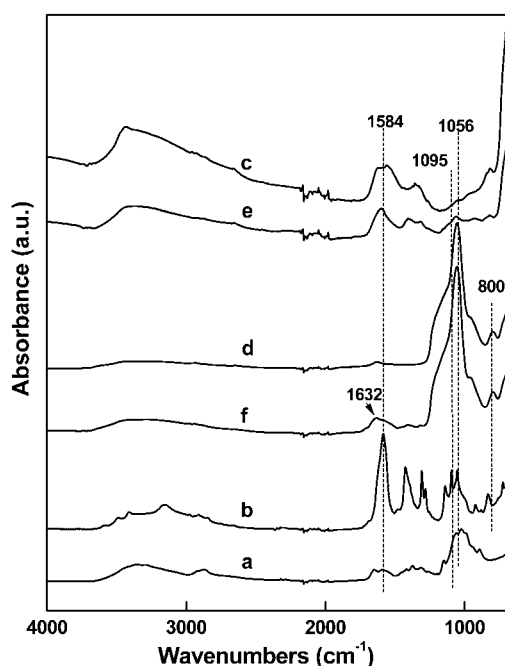


Fig. 2 ATR FTIR spectra of (a) CS, (b) CMCS, (c) neat γ -Fe₂O₃ nanoparticles, (d) γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles, (e) γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles and (f) γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles.

(Fig. 2(a)). In the spectrum of CMCS, peaks at 1095 cm⁻¹ attributable to the C–O stretching vibrations and at 1584 cm⁻¹ were observed (Fig. 2(b)). The latter peak was intense and broad, which resulted from the overlapping of the peaks of NH₂ (1590 cm⁻¹), COOH (1710 cm⁻¹) and COO⁻ (1598 cm⁻¹) vibrations, which in turn resulted when COOH transferred to COONa.⁴⁰ The band with the maximum at 1584 cm⁻¹ could also be detected in the spectrum of γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles (Fig. 2(e)). The spectra of γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles (Fig. 2(d)) and γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles (Fig. 2(f)) displayed two strong peaks at 1056 cm⁻¹ and 800 cm⁻¹, which were assigned to the un-symmetric and symmetric stretching vibrations of Si–O–Si bonding, respectively. This indicated the presence of the silica layer on the surface of the γ -Fe₂O₃ nanoparticles. The presence of the primary amino groups (–NH₂) in the spectrum of chitosan (Fig. 2(a)) was confirmed by the peak at 1590 cm⁻¹. In the

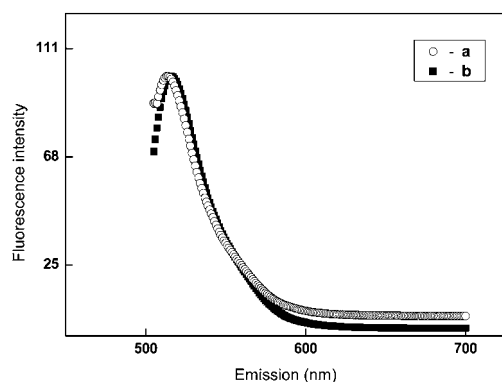


Fig. 3 Normalized fluorescence emission spectra of (a) neat FITC ($c = 1.4 \mu\text{M}$) and (b) FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles ($c = 40 \text{ mg L}^{-1}$); $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, in 1% NH₄OH aqueous solution.

Table 2 r_2 relaxivities of the synthesized nanoparticles

Nanoparticles	r_2 at 0.5 T/s ⁻¹ mM ⁻¹	r_2 at 4.7 T/s ⁻¹ mM ⁻¹
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -SiO ₂ -AP	12.26 ± 0.05	28.2 ± 0.9
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -SiO ₂ -AP-CMCS	22.8 ± 0.2	42.4 ± 0.4
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -CMCS	28.7 ± 0.3	47.5 ± 0.5

spectrum of γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, the NH₂ peak was overlapped with the peaks of COOH (1710 cm⁻¹) and NHCO (1626 and 1551 cm⁻¹) vibrations, and a new characteristic broad peak at 1632 cm⁻¹ was observed (Fig. 2(f)).

3.4. Preparation of fluorescein-modified silica- and CMCS-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles

The synthesis of the FITC-labeled γ -Fe₂O₃ nanoparticles involved three reactions of the FITC isothiocyanate groups with the primary amino groups on the surface of (i) the γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles (Scheme 2), (ii) γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles (Scheme 2) and (iii) γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles. It is thought that the reactions result in the formation of a stable thiourea linkage between FITC and APTES or CMCS on the nanoparticle surface.

To confirm the attachment of FITC to the γ -Fe₂O₃ nanoparticles, FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP particles were analyzed by fluorescence spectroscopy. The fluorescence of FITC was measured in a 1% aqueous NH₄OH solution. The emission spectra were recorded at an excitation wavelength $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ over the range of emission wavelengths $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}700 \text{ nm}$ (Fig. 3). As a control, the fluorescence emission spectrum of neat FITC was also recorded for comparison. Both neat FITC and FITC-labeled γ -Fe₂O₃ nanoparticles showed the same emission fluorescence peaks at 516 nm and very similar emission spectrum shapes (Fig. 3). No fluorescence was observed in the spectrum of the supernatant after washing of the FITC-labeled γ -Fe₂O₃ nanoparticles. This means that the γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles were successfully modified with FITC *via* the formation of a stable bond without fluorophore degradation.

Relaxation time measurements revealed lower relaxivities of FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP, γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS and

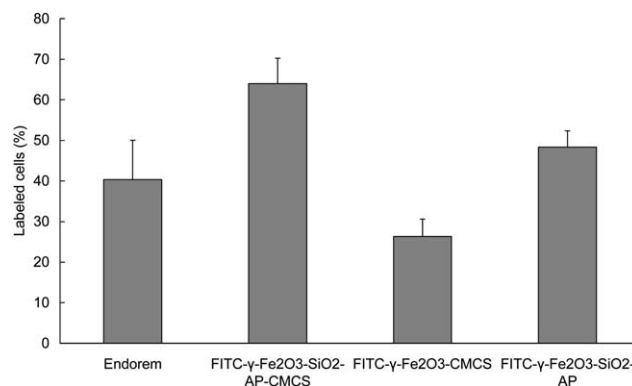


Fig. 4 Labeling efficiency of rMCSs labeled with Endorem® (control), FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, FITC-labeled γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles and FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles.

Table 3 R_2 relaxation rates of labeled cell suspensions and estimated iron content per one cell

Cells labeled by	R_2 at 0.5 T/s ⁻¹ per 10 ⁶ cells in 1 mL	R_2 at 4.7 T/s ⁻¹ per 10 ⁶ cells in 1 mL	Iron amount/pg per cell
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -SiO ₂ -AP	6.9 ± 0.2	12.7 ± 1.0	28.2 ± 3.2
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -SiO ₂ -AP-CMCS	5.95 ± 0.05	9.57 ± 0.05	13.6 ± 1.0
FITC-labeled γ -Fe ₂ O ₃ -CMCS	2.83 ± 0.03	4.70 ± 0.15	5.5 ± 0.2

γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles (Table 2) compared to commercial (carboxy)dextran-coated iron oxides,⁵⁶ which may be due to the silica or CMCS coating.

3.5. Cell experiments

Cell labeling with superparamagnetic iron oxides is an increasingly common method for *in vivo* cell monitoring and separation,⁵⁷ as the labeled cells can be detected by magnetic resonance imaging. In order to examine the acute toxicity of FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP, FITC-labeled γ -Fe₂O₃-CMCS and FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS

nanoparticles, they were incubated with rMSCs for 72 h. Endorem® served as a control. Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion test. The viability of rat MSCs labeled with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP, FITC-labeled γ -Fe₂O₃-CMCS, FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles or with Endorem® was not affected, reaching over 90% and suggesting the biocompatibility (non-toxicity) of the newly developed fluorescent magnetic nanoparticles. Also, the growth of cells in comparison with an unlabeled control was not affected.

As Prussian Blue is a sensitive iron-selective stain, labeling efficiency was assessed by counting Prussian Blue-positive cells.

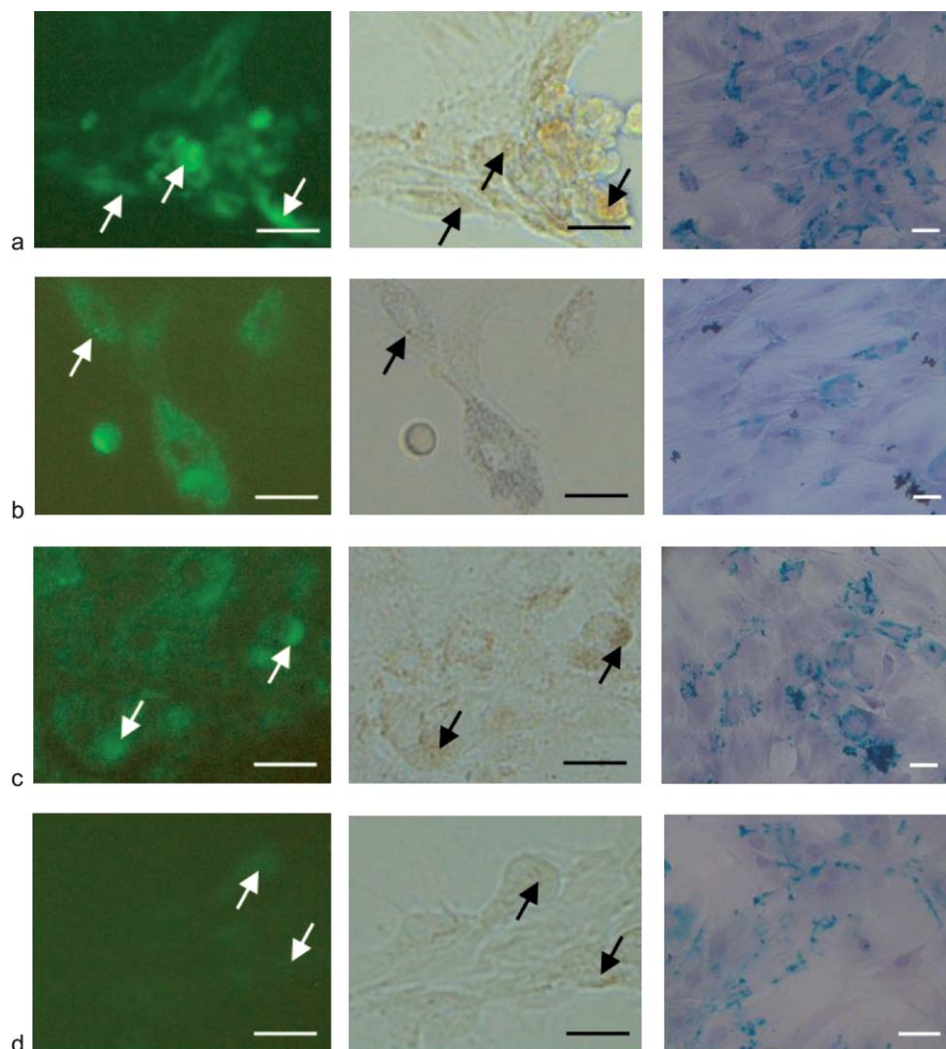


Fig. 5 Left column: fluorescent micrographs of rMSCs labeled with (a) FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, (b) FITC-labeled γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles, (c) FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles, and (d) Endorem®. Middle column shows the same cells in an optical field. Arrows mark iron deposits in the cells. Scale bar 50 μ m. Right column shows Prussian Blue staining for iron. Scale bar 20 μ m.

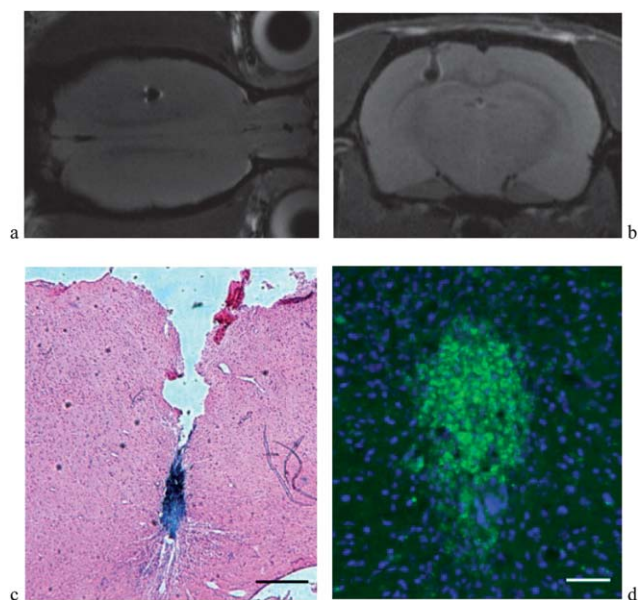


Fig. 6 (a) Coronal and (b) axial magnetic resonance images from a rat brain implanted with 100 000 rMSCs labeled with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles. (c) Cell implant stained for iron using Prussian Blue. Scale bar 0.5 mm. (d) Cell implant visualized in a fluorescent microscope (green), DAPI (blue) stained cell nuclei. Scale bar 50 μ m.

All the cells in each optical field (200 ± 30) were counted and the labeling efficiency was expressed as percentage of Prussian Blue-positive cells. The best results were achieved with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, where about 64% (64 ± 3.6) of cells were labeled. FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP nanoparticles labeled 48% (48.3 ± 4.0) of cells (Fig. 4). This result was comparable with Endorem® labeling of cells, which reached 40% (40.3 ± 2.0). The worst result was obtained with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-CMCS nanoparticles, where only 26% (26.3 ± 2.6) of the cells were labeled. Fig. 5 compares the fluorescence intensity. The left and middle columns are from identical cells. Native unstained images of live cells have clear brown deposits from γ -Fe₂O₃ particles (middle column, black arrows) that clearly correspond to the green fluorescence (white arrows, left column). To distinguish from intrinsic cell autofluorescence, images from Endorem®-labeled cells were included in Fig. 5. Iron oxide deposits showed less fluorescence than FITC-labeled nanoparticles. The right column represents Prussian Blue-stained nanoparticles. The images were taken from the same experiment; however, the cells were not identical. Images in the right column correlate with the labeling efficiency reported in Fig. 4. The differences in labeling efficiency among the different types of nanoparticles were statistically significant (ANOVA on the level $\alpha = 0.01$).

Relaxation measurements reflect the amount of γ -Fe₂O₃ taken up into the cells. *In vitro* relaxation time measurements confirmed a large amount of iron inside the cells (Table 3). The estimated average amount of iron per cell in the case of FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP was more than two times higher compared to commercially available iron oxide labels,⁵⁸ which compensated for the lower relaxivity of the nanoparticles themselves. The differences in iron content in the cells incubated with various

types of nanoparticles were statistically significant (ANOVA on the level $\alpha = 0.01$).

3.6. *In vivo* MR imaging

To demonstrate the visualization of labeled cells *in vivo*, 100 000 cells labeled with FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles were injected into a rat brain in 3 μ L of PBS. The cell implant was nicely visible on MR images as a hypointense spot with excellent contrast against the surrounding tissue (Fig. 6 (a) and (b)). Histology confirmed iron oxide deposits in the cell implant that corresponded to Prussian Blue staining (Fig. 6(c)). The cell implant was also visible when viewed under a fluorescence microscope (Fig. 6(d)).

4. Conclusions

In order to design the dual detection of cells involving imaging by fluorescence and magnetic resonance, two reporters have been included in one particle: a fluorescent dye and a super-paramagnetic core. The synthesis procedures to conjugate fluorescent dyes on the magnetic nanoparticle surface required multi-step chemical treatments. In order that the fluorescein-based luminescent component was effectively separated from the maghemite, which is critical in protecting the luminescence from quenching by iron oxide, inert silica, or optionally chitosan layers, was coated on the iron oxide surface. At the same time, this improved the colloidal stability of the particles in the aqueous phase. At feed concentrations ≥ 5 μ mol APTES per m² of silica-coated γ -Fe₂O₃ nanoparticles, the iron oxide nanoparticle surface was completely covered with the silica. An organic fluorophore (FITC) was chemically anchored to magnetic γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP or γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles, an approach that is preferred to simple dye adsorption on the γ -Fe₂O₃-CMCS particles' surface because the latter can easily desorb, thus affecting the response of biological systems to the nanoparticles. FITC-labeled γ -Fe₂O₃-SiO₂-AP-CMCS nanoparticles were best internalized by rMSCs, enabling the visualization of labeled cells *in vivo*. Both CMCS and silica shells were thus necessary to prevent fluorescence quenching of the nanoparticles because FITC was not directly conjugated to the γ -Fe₂O₃ core but isolated from the environment *via* the shells. The introduction of such cells into the organism, their movement and migration *in vivo* can then be easily monitored by MRI, while optical imaging continuously observes the dynamic intracellular processes of the living cells. Moreover, the fluorescent dye makes quantification after incubation with cells possible. In the future, even trifunctional particles with fluorescence, magnetism and cell recognition can be envisaged.

Bringing together MR and fluorescent molecular imaging, fluorescein-labeled γ -Fe₂O₃ nanoparticles coated with amino-propylated silica or partly carboxymethylated chitosan can be used for both magnetic and fluorescent labeling, thus providing a powerful tool to study the interaction of the nanoparticles with biological systems. Such labeling offers the possibility of tracking cells by MRI and fluorescent spectroscopic measurements or fluorescent microscopy in cell cultures or even in living organisms.

Acknowledgements

The financial support of the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 203/09/1242 and 309/08/H079), the Academy of Sciences of the Czech Republic (KAN200200651), the Center for Cell Therapy and Tissue Repair (grant 1M0538) and the EU grant No. 228980 (CAMINEMS) is gratefully acknowledged.

References

- 1 B. Perlstein, T. Lublin-Tennenbaum, I. Marom and S. Margel, Synthesis and characterization of functionalized magnetic maghemite nanoparticles with fluorescent probe capabilities for biological applications, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2010, **92**, 353–360.
- 2 S. Laurent, J. L. Bridot, L. V. Elst and R. N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Future Med. Chem.*, 2010, **2**, 427–449.
- 3 C. Corot, P. Robert, J. M. Idée and M. Port, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, **58**, 1471–1504.
- 4 C. Sun, J. S. H. Lee and M. Zhang, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, **60**, 1252–1265.
- 5 Z. T. Tsai, J. F. Wang, H. Y. Kuo, C. R. Shen, J. J. Wang and T. C. Yen, *In situ* preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: a potential MRI contrast agent useful for cell tracking, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2010, **322**, 208–213.
- 6 O. Veisheh, J. W. Gunn and M. Zhang, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 284–304.
- 7 J. H. Lee, K. Lee, S. H. Moon, Y. H. Lee, T. G. Park and J. Cheon, All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery, *Angew. Chem.*, 2009, **48**, 4174–4179.
- 8 A. Ito, K. Tanaka, H. Honda, S. Abe, H. Yamaguchi and T. Kobayashi, Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles, *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, **96**, 364–369.
- 9 M. Salloom, R. Ma and L. Zhu, Enhancement in treatment planning for magnetic nanoparticle hyperthermia: optimization of the heat absorption pattern, *Int. J. Hyperthermia*, 2009, **25**, 309–321.
- 10 I. Šafařík and M. Šafaříková, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn. Res. Technol.*, 2004, **2**, 7–34.
- 11 Z. Zhao, Z. Bian, L. Chen, X. He and Y. Wang, Synthesis and surface-modifications of iron oxide magnetic nanoparticles and applications on separation and analysis, *Prog. Chem.*, 2006, **18**, 1288–1297.
- 12 A. Kaushik, P. R. Solanki, A. A. Ansari, B. D. Malhotra and S. Ahmad, Iron oxide-chitosan hybrid nanobiocomposite based nucleic acid sensor for pyrethroid detection, *Biochem. Eng. J.*, 2009, **46**, 132–140.
- 13 A. Quarta, R. Di Corato, L. Manna, A. Ragusa and T. Pellegrino, Fluorescent-magnetic hybrid nanostructures: preparation, properties, and applications in biology, *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 2007, **6**, 298–308.
- 14 Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E. P. Furlani and P. N. Prasad, Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labeling and magnetophoretic control, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3879–3885.
- 15 S. A. Corr, Y. P. Rakovich and Y. K. Gun'Ko, Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications, *Nanoscale Res. Lett.*, 2008, **3**, 87–104.
- 16 P. Howes, M. Green, A. Bowers, D. Parker, G. Varma, M. Kallumadil, M. Hughes, A. Warley, A. Brain and R. Botnar, Magnetic conjugated polymer nanoparticles as bimodal imaging agents, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9833–9842.
- 17 S. S. Banerjee and D. H. Chen, A multifunctional magnetic nanocarrier bearing fluorescent dye for targeted drug delivery by enhanced two-photon triggered release, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 185103.
- 18 J. Yang, E. K. Lim, H. J. Lee, J. Park, S. C. Lee, K. Lee, H. G. Yoon, J. S. Suh, Y. M. Huh and S. Haam, Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection, *Biomaterials*, 2008, **29**, 2548–2555.
- 19 P. Tseng, D. Di Carlo and J. W. Judy, Rapid and dynamic intracellular patterning of cell-internalized magnetic fluorescent nanoparticles, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 3053–3059.
- 20 J. J. Gallagher, R. Tekoriute, J. A. O'Reilly, C. Kerskens, Y. K. Gun'Ko and M. Lynch, Bimodal magnetic-fluorescent nanostructures for biomedical applications, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 4081–4084.
- 21 Y. Ge, Y. Zhang, S. He, F. Nie, G. Teng and N. Gu, Fluorescence modified chitosan-coated magnetic nanoparticles for high-efficient cellular imaging, *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, **4**, 287–295.
- 22 Y. Ichiyanagi, S. Moritake, S. Taira and M. Setou, Functional magnetic nanoparticles for medical application, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, **310**, 2877–2879.
- 23 J. H. Lee, B. Schneider, E. K. Jordan, W. Liu and J. A. Frank, Synthesis of complexable fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles (fI spions) and cell labeling for clinical application, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 2512–2516.
- 24 F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Menager and V. Cabuil, Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: intracellular uptake and use in cellular imaging, *Langmuir*, 2006, **22**, 5385–5391.
- 25 C. Ren, J. Li, X. Chen, Z. Hu and D. Xue, Preparation and properties of a new multifunctional material composed of superparamagnetic core and rhodamine b doped silica shell, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 345604.
- 26 N. Li, H. Li, D. Chen, H. Liu, F. Tang, Y. Zhang, J. Ren and Y. Li, Preparation and characterization of quantum dots coated magnetic hollow spheres for magnetic fluorescent multimodal imaging and drug delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2009, **9**, 2540–2545.
- 27 Z. Y. Ma, D. Dosev, M. Nickkova, S. J. Gee, B. D. Hammock and I. M. Kennedy, Synthesis and bio-functionalization of multifunctional magnetic Fe₃O₄@Y₂O₃:Eu nanocomposites, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 4695–4700.
- 28 I. J. Bruce and T. Sen, Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations, *Langmuir*, 2005, **21**, 7029–7035.
- 29 D. B. Tada, L. L. R. Vono, E. L. Duarte, R. Itri, P. K. Kiyohara, M. S. Baptista and L. M. Rossi, Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy, *Langmuir*, 2007, **23**, 8194–8199.
- 30 W. H. Tan, K. M. Wang, X. X. He, X. J. Zhao, T. Drake, L. Wang and R. P. Bagwe, Bionanotechnology based on silica nanoparticles, *Med. Res. Rev.*, 2004, **24**, 621–638.
- 31 Y. Lu, Y. D. Yin, B. T. Mayers and Y. N. Xia, Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach, *Nano Lett.*, 2002, **2**, 183–186.
- 32 X. Hun, Z. Zhang and L. Tiao, Anti-Her-2 monoclonal antibody conjugated polymer fluorescent nanoparticles probe for ovarian cancer imaging, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **625**, 201–206.
- 33 T. Kean and M. Thanou, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 3–11.
- 34 Y. M. Yang, W. Hu, X. D. Wang and X. S. Gu, The controlling biodegradation of chitosan fibers by *n*-acetylation *in vitro* and *in vivo*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007, **18**, 2117–2121.
- 35 K. A. Janes, P. Calvo and M. J. Alonso, Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **47**, 83–97.
- 36 M. N. Kumar, R. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa and A. J. Domb, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 6017–6084.
- 37 T. Kean and M. Thanou, Chitin and Chitosan—Sources, Production and Medical Applications, in *Desk Reference of Natural Polymers, their Sources, Chemistry and Applications*, ed. P. A. Williams and R. Arshady, Kentus Books, London, 2009, pp. 327–361.
- 38 A. P. Zhu, N. Fang, M. B. Chan-Park and V. Chan, Interaction between *O*-carboxymethylchitosan and dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayer, *Biomaterials*, 2005, **26**, 6873–6879.
- 39 A. Zhu, M. B. Chan-Park, S. Dai and L. Li, The aggregation behavior of *O*-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution, *Colloids Surf., B*, 2005, **43**, 143–149.

- 40 X. G. Chen and H. J. Park, Chemical characteristics of *O*-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions, *Carbohydr. Polym.*, 2003, **53**, 355–359.
- 41 J. Magali, A. Hernandez, A. Maurras, K. Puget, M. Amblard, J. Martinez and G. Subra, *N*-terminus FITC labeling of peptides on solid support: the truth behind the spacer, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 260–263.
- 42 S. Vira, E. Mekhedov, G. Humphrey and P. S. Blank, Fluorescent-labeled antibodies: balancing functionality and degree of labeling, *Anal. Biochem.*, 2010, **402**, 146–150.
- 43 N. Dias, J. F. Goossens, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, P. Colson, A. Di Salvo, J. Bernal, A. Turnbull, D. Mincher and C. Bailly, Oxoazabenzodeanthracenes conjugated to amino acids: synthesis and evaluation as DNA-binding antitumor agents, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 949–958.
- 44 K. Pachmann, K. Reinecke, B. Emmerich and E. Thiel, Highly fluorochrome labeled gene probes for quantitative tracing of RNA in individual cells by *in situ* hybridization, *Bioconjugate Chem.*, 1991, **2**, 19–25.
- 45 M. Hruby, C. Konak and K. Ulbrich, Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin, *J. Controlled Release*, 2005, **103**, 137–148.
- 46 Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro and K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 122–130.
- 47 M. Babič, D. Horák, P. Jendelová, K. Glogarová, V. Herynek, M. Trchová, K. Likavčanová, M. Hájek and E. Syková, Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 283–294.
- 48 Z. L. Shi, K. G. Neoh, E. T. Kang, B. Shuter, S. C. Wang, C. Poh and W. Wan, (Carboxymethyl)chitosan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of stem cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, **1**, 328–335.
- 49 S. Čampelj, D. Makovec and M. Drofenik, Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, **321**, 1346–1350.
- 50 O. Hiraku and M. Yoshiharu, Biodegradation and distribution of water-soluble chitosanin mice, *Biomaterials*, 1999, **20**, 175–182.
- 51 S. A. Azizi, D. Stokes, B. J. Augelli, C. DiGirolamo and D. J. Prockop, Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats. Similarities to astrocyte grafts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 3908–3913.
- 52 K. A. Carvalho, C. C. Cury, L. Oliveira, R. I. Cattaned, M. Malvezzi, J. C. Francisco, A. Pachalok, M. Olandoski, J. R. Faria-Neto and L. C. Guarita-Souza, Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency, *Transplant. Proc.*, 2008, **40**, 839–841.
- 53 R. K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979.
- 54 M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamurad and H. E. Toma, Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, **279**, 210–217.
- 55 J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Arguëlles-Monal, J. DesbrieÁres and M. Rinaudo, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 2001, **42**, 3569–3580.
- 56 M. Babič, D. Horák, P. Jendelová, K. Glogarová, V. Herynek, M. Trchová, K. Likavčanová, M. Hájek and E. Syková, Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 283–294.
- 57 O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad and M. Uhlen, Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, **7**, 43–54.
- 58 P. Jendelová, V. Herynek, J. DeCroos, K. Glogarová, B. Andersson, M. Hájek and E. Syková, Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles, *Magn. Reson. Med.*, 2003, **50**, 767–776.